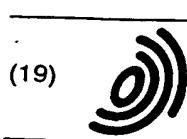


AE 322



(19)

Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11)

EP 0 775 750 A2

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:
28.05.1997 Patentblatt 1997/22

(51) Int Cl. 6: C12N 15/62, C12N 9/64,
C07K 19/00, C12N 5/10,
C07K 14/755, C07K 14/16,
C07K 14/765, A61K 38/37,
A61K 38/48, A61K 38/38

(21) Anmeldenummer: 96890171.0

(22) Anmeldetag: 19.11.1996

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK ES FI FR GB IT LI NL PT SE

- Falkner, Falko-Günter, Dr.
2304 Orth/Donau (AT)
- Dorner, Friedrich, Prof.
1230 Wien (AT)
- Eibl, Johann, Dr.
1180 Wien (AT)

(30) Priorität: 24.11.1995 AT 1928/95

(71) Anmelder: IMMUNO Aktiengesellschaft
A-1221 Wien (AT)

(72) Erfinder:

- Schlokat, Uwe, Dr.
2304 Orth/Donau (AT)
- Fischer, Bernhard, Doz.
1120 Wien (AT)

(74) Vertreter: Alge, Daniel et al
Patentanwälte
Sonn, Pawloy, Weinzinger & Wolfram
Riemergasse 14
1010 Wien (AT)

(54) **Herstellung von Proteinen aus Pro-Proteinen durch Fusionsproteine abgeleitet von Furin**

(57) Beschrieben werden Fusionsproteine aus einem gegebenenfalls C-terminal deletiertem Furinderivat oder Derivat eines Furinanalogen und einer hetero-

logen Sequenz, Verfahren zu deren Herstellung, sowie Verfahren zur Gewinnung von Pro-Proteinen aus Proteinen unter Verwendung der erfindungsgemäßen Pro-Proteine.

EP 0 775 750 A2

B schreibung

Die Erfindung betrifft ein neues Fusionsprotein, abgeleitet von Furin oder einem Furinanalogen, sowie ein Verfahren zur Herstellung von Proteinen aus Pro-Proteinen durch das Fusionsprotein, insbesondere von von Willebrand-Faktor aus pro-von Willebrand-Faktor.

5 Furin, auch PACE genannt, gehört neben PACE4, PC1/PC3, PC2, PC4 und PC5/PC6 zur Gruppe der Subtilisin-ähnlichen Serin-Proteasen, die eine wichtige Rolle bei der Spaltung von Pro-Proteinen, speziell im sekretorischen 10 Syntheseweg, spielen (Van de Ven et al., Crit. Rev. Oncogen., 4:115-136, 1993). Pro-Proteine werden post-translativ, intrazellulär im Golgi-Apparat durch die endogene Protease in ihre reife Form prozessiert. Die Protease-Spaltstelle weist eine Erkennungssequenz auf, die durch die Aminosäuresequenz Arg-X-Lys/Arg-Arg gekennzeichnet ist. 15 Die Protease Furin spaltet Pro-Proteine spezifisch nach dieser Konsensus-Sequenz (Hosaka et al., J. Biol. Chem. 266: 12127-12130, 1991).

Die DNA- und Aminosäuresequenz des humanen und des murinen Furins, sowie weitere Proteine mit Subtilisin-ähnlicher Proteasefunktion sind aufgeklärt (Roebroek et al., Mol. Biol. Rep. 11: 117-125, 1986, Roebroek et al., EMBO 15 J. 5:2197-2202, 1986, Barr et al., DNA Cell Biol. 10:319-328, 1991, Van den Ouwehand et al., Nucleic Acids Res. 17: 7101-7102, 1989, Van den Ouwehand et al., Nucleic Acids Res. 18:664, 1990, Smeekens et al. 1990, J. Biol. Chem. 265:2997-3000; Smeekens et al 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88: 340-344; Kiefer et al 1991, DNA Cell. Bio. 10: 757; Nakayama et al 1992, J. Bio. Chem. 267:5897-5900, Hatsuzawa et al. 1990. J. Biol. Chem. 265:22075-22078). Das humane fur-Gen kodiert für ein Protein bestehend aus 794 Aminosäuren, wobei einzelnen, charakteristischen 20 Bereichen bestimmte Funktionen zugeordnet werden können: ein katalytisches Zentrum, eine Mitteldomäne, eine Cystein-reiche Region, eine transmembrane und eine cytoplasmatische Domäne (Van de Ven et al., Crit. Rev. Oncogen., 4:115-136, 1993).

Intaktes Furin wird in das Membransystem des Golgi-Apparates eingebaut und ist dort funktionell aktiv (Bresnahan et al., J. Cell Biol. 111:2851-2859, 1990). Eine trunkierte Form des überexprimierten nativen Furins von 75-80 kD 25 konnte im Zellüberstand als sezerniertes Protein detektiert werden (Wise et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 9378-9382, 1990). Dieses natürlich sekretierte Furin ist als "shed furin" bekannt (Vidricaire et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 195:1011-1018, 1993) und wird N-terminal des transmembranen Teils gespalten (Vey et al. J. Cell Biol. 127:1829-1842, 1994).

Gentechnisch verkürztes Furin, bei dem der kodierende Teil der transmembranen und cytoplasmatischen Domäne 30 defiziert ist, kann ebenfalls exprimiert und entsprechend sezerniert werden. Solche N-terminalen Deletionen wurden für Aminosäuren Δ714-794 (Leduc et al. J. Biol. Chem. 267:14304-14308, 1992, Molloy et al. J. Biol. Chem. 267: 16396-16402, 1992) und für Aminosäuren Δ716-794 ("Sol-PACE") erstellt (Wasley et al. 1993. J. Biol. Chem. 268: 8458-8465, Rehemtulla et al. Blood 79:2349-2355, 1992) und für Aminosäure Δ705-794 (Hatsuzawa et al. 1992. J. Biol. Chem. 267: 16094-16099) beschrieben.

35 Furinmutanten, die zusätzlich eine Deletion der cysteinreichen Region aufweisen wurden ebenfalls beschrieben (Hatsuzawa et al. 1992. J. Biochem. 101:296-301, Creemers et al. 1993. J. Biol. Chem. 268:21826-21834).

Die endoproteolytische Aktivität von Furin und seine Selektivität für basische Aminosäuren wurde erstmals in Experimenten mit pro-von Willebrand-Faktor (pro-vWF) festgestellt. Pro-vWF besteht aus einem Propolypeptid mit 741 Aminosäuren und maturem von Willebrand-Faktor (vWF) mit 2050 Aminosäuren (Verweij et al., EMBO J. 5:1839-1847, 40 1986). Die Freisetzung von maturem vWF aus pro-vWF resultiert aus einer proteolytischen Spaltung nach Arg763. Transfektion von pro-vWF cDNA in eukaryotischen Expressionsvektoren führt zur Produktion von äquimolaren Mengen des 360 kD pro-vWF und des 260 kD reifen vWF im Zellkulturüberstand. vWF wird in seine reife Form in transfizierten Zellen vermutlich durch endogen vorkommendes Furin prozessiert (Wise et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 9378-9382, 1990, Van de Ven et al., Mol. Biol. Rep. 14:265-275, 1990).

45 Zu den weiteren Pro-Proteinen, die von Furin, bzw. von Subtilisin-ähnlichen Enzymen gespalten werden, gehören eine Reihe von Hormonen und Wachstumsfaktoren (z.B. Proaktivin A, Hepatozyten-Wachstumsfaktor), Plasmaproteinen (Albumin, Faktor VII, Faktor IX, Faktor X), Rezeptoren (Insulin-Prorezeptor), viralen Proteinen (z. B. HIV-1 gp160, Influenza Virus Hämaggglutinin) sowie bakteriellen Proteinen (Diphtherie-Toxin, Anthrax-Toxin) (Decroly et al., J. Biol. Chem. 269:12240-12247, 1994, Stieneke-Gröber et al., EMBO J. 11:2407-2414, 1992, Barr, Cell 66:1-3, 1991, Wasley et al., J. Biol. Chem. 268:8458-8465, 1993, Klimpel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10277-10281, 1992, Tsuneoka et al., J. Biol. Chem. 268:26461-26465, 1993, Bresnahan et al., J. Cell Biol. 111:2851-2859, 1990, Hosaka et al., J. et al., J. Biol. Chem. 268:26461-26465, 1993, Bresnahan et al., J. Cell Biol. 111:2851-2859, 1990, Hosaka et al., J. Biol. Chem. 266:12127-12130, 1991, Vey et al. J. Cell. Biol. 127: 1829-1842, 1994).

50 Durch Koexpression der für intaktes Furin und für ein Pro-Protein kodierenden Nukleinsäuresequenzen in eukaryotischen Zellkulturen wurde eine erhöhte Prozessierung der Pro-Proteine in vivo erreicht. Dies wurde zum Beispiel für pro-Faktor IX (Wasley et al., J. Biol. Chem. 268:8458-8465, 1993) und pro-vWF (WO 91/06314, Van de Ven et al. Mol. Bio. Rep. 14:265-275, 1990, Rehemtulla et al., Blood 79:2349-2355, 1992) gezeigt.

55 Neben der Koexpression von intaktem Furin mit Pro-Proteinen gibt es ebenfalls Ansätze, trunkiertes Furin mit Pro-Proteinen gemeinsam zu exprimieren. Deletiertes Furin ist bei Koexpression in vivo enzymatisch aktiv und wird sezerniert.

niert; die enzymatische Aktivität solcher Deletionsmutanten konnte unter anderem bei der Prozessierung von pro-Faktor IX (Wasley et al., J. Biol. Chem. 268:8458-8465, 1993) und pro-vWF (Rehemtulla et al., Blood 79: 2349-2355, 1992) nachgewiesen werden. Koexpressionsexperimente mit Furin-Deletionsmutanten zeigten, daß der transmembranäre und der cytoplasmatische Teil des Proteins für die katalytische Funktion nicht wesentlich sind (Rehemtulla et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 8235-8239, 1992).

WO 91/06314 offenbart die rekombinante Expression von Furin in prokaryotischen und eukaryotischen Zellen, die Herstellung von Furin-Fusionsproteinen, -Deletionsmutanten und -Fragmenten, die Reinigung von rekombinant hergestelltem Furin, sowie die mögliche Verwendung von gereinigtem Furin für die Prozessierung von Pro-Proteinen in vitro im allgemeinen.

WO 92/09698 beschreibt die Expression von PACE (Furin), die Koexpression mit inaktiven Vorstufen von Proteinen wie z.B. pro-vWF, sowie die Herstellung von Fusionsproteinen. Zur Anreicherung von PACE wird dabei vorgeschlagen, sekretionsfähiges PACE über konventionelle Methoden zu isolieren.

Stieneke-Gröber et al. (EMBO J. 11:2407-2414, 1992) beschreiben die in vitro-Spaltung von Influenza-Virus-HA-Protein durch gereinigtes Furin. Decroly et al. (J. Biol. Chem. 269: 12240-12247, 1994) beschreiben die in vitro-Spaltung von HIV gp160 durch Furin.

Bei Versuchen mit C-terminal verkürztem Furin konnte in vitro die Spaltung von Proalbumin und Komplement C3 (Oda et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 189:1353-1361, 1992), Anthrax-Toxin (Klimpel et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10277-10281, 1992), Diphtherie-Toxin (Tsuneoka et al., J. Biol. Chem. 268: 26461-26465, 1993) und pro-Faktor IX (Wasley et al. J. Biol. Chem. 268: 8458-8468, 1993, Bristol et al., Biochemistry 33: 14136-14143, 1994) erfolgreich durchgeführt werden.

In vitro-Prozessierung von pro-vWF durch Furin konnte bisher nicht gezeigt werden. Rehemtulla et al. (Blood 79: 2349-2355, 1992 und Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:8235-8239, 1992) beschreiben, daß durch Mischen von Überständen von Zellen, transfiziert mit pro-vWF bzw. deletiertem Furin ("PACE SOL"), pro-vWF nicht zu vWF prozessiert wird. Im Gegensatz dazu konnten mittels gereinigtem "PACE SOL" in vitro sowohl synthetische Substrate (Rehemtulla et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:8235-8239, 1992), als auch pro-Faktor IX (Bristol et al., Biochemistry 33: 14136-14143, 1994) gespalten werden. Für pro-vWF wurde weiterhin postuliert, daß er in vitro durch truncated Furin nicht in seine reife Form prozessiert wird (Rehemtulla et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:8235-8239, 1992 und Blood 79:2349-2355, 1992), während unter analogen Bedingungen Faktor IX gespalten wird (Wasley et al. 1993. J. Biol. Chem. 268:8458-8465).

Um bei der rekombinanten Herstellung von Proteinen aus Pro-Proteinen hohe Ausbeuten an vollständig prozessierten Proteinen zu erhalten, wurde es gemäß dem Stand der Technik als notwendig angesehen, eine genügend große Menge an Furin zu exprimieren und zu isolieren, oder das Pro-Protein und Furin zu koexprimieren.

Bei der rekombinanten Expression von Furin alleine, aber auch bei der Koexpression von Furin mit einem Protein im großtechnischen Ansatz in Zellkultur tritt allerdings das Problem auf, daß eine hohe Expression der Protease toxisch für die Zellen ist (Creemers 1994), wodurch nur eine geringe Ausbeute an Furin und an reifem Protein möglich wird. So konnte in Koexpressionsstudien gezeigt werden, daß Zellklone, die Furin hoch exprimieren und das Protein effizient prozessieren, zu weitaus geringeren Zeldichten wachsen im Vergleich zu Zellen, die kein Furin exprimieren. Daraus resultiert eine schlechtere Gesamtausbeute an prozessiertem Protein. Um eine hohe Ausbeute an reifem Protein zu erhalten, muß daher eine sehr lange Kultivierungszeit in Kauf genommen werden; der Bedarf an Kultivierungsgefäß und -geräten ist dadurch groß, was in der Folge auch erhöhte Kontaminationsprobleme mit sich bringen kann.

Bisher konnten nach rekombinanter Expression Furin oder Furinderivate nur immunologisch im Westernblot detektiert werden (Molloy et al. 1994. EMBO J. 13:18-33). Versuche, Furin oder Furinderivate hoch zu exprimieren, gelangten bisher nur im Baculovirus-Expressionssystem, wobei eine 20-30fach höhere Expression als in transfizierten Säugerzellen postuliert wurde (Bravo et al., 1994.. J. Biol. Chem. 269:25830-25837). Allerdings ist, trotz der relativ hohen Ausbeute an Furin im Vergleich zu anderen Zellsystemen, das Wachstum dieser virusinfizierten Zellen aufgrund der Zellyse als Folge der Virusvermehrung beschränkt. Eine gute Expression, sowie die Isolierung und Reinigung von Furin oder Furinderivaten, stellt für den immer breiter werdenden Anwendungsbereich von Furin bzw. von Furinderivationen z.B. bei der rekombinanten Herstellung von furin-prozessierten Proteinen aus Pro-Proteinen, eine große Bedeutung und Notwendigkeit dar.

Da eine Überexpression der Protease das Wachstum von kontinuierlich wachsenden Zellkulturen negativ beeinflußt, wurden Lösungsansätze gesucht, um den toxischen Einfluß von Furin auf die Zellen zu reduzieren. Weiter besteht ein Bedarf nach einem verbesserten Verfahren zur Prozessierung von furin-aktivierten Proteinen aus Pro-Proteinen, insbesondere für die großtechnische Herstellung von rekombinanten Blutfaktoren, wie etwa pro-vWF.

Das Ziel der vorliegenden Erfindung ist daher ein Verfahren zur Herstellung von Furin oder einem Furinderivat aus einer kontinuierlich wachsenden, rekombinanten Zellkultur unter Aufrechterhaltung der enzymatischen Aktivität des Furins oder Furinderivats zur Verfügung zu stellen, ohne daß die Zellkultur wesentlichen Schaden durch die erhöhte proteolytische Aktivität nimmt.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung besteht darin, ein verbessertes Verfahren zur furin-abhängigen proteolytischen Spaltung von Pro-Proteinen zu Proteinen, insbesondere ein neues Verfahren zur Prozessierung von pro-Willebrand-Faktor zu reifem, aktivem von Willebrand-Faktor, zur Verfügung zu stellen.

Diese Aufgaben werden erfindungsgemäß gelöst durch Zurverfügungstellung von neuen Fusionsproteinen, die aus einem Furinderivat oder einem Derivat eines Furinanalogen, fusioniert mit einer heterologen Sequenz, welche zur Adsorption des Furins an einen festen Träger befähigt, bestehen, bei dem gegebenenfalls der C-terminale Bereich durch Deletion entfernt ist und durch eine heterologe Sequenz ersetzt ist.

Die erfindungsgemäßen Furin- oder Furinanalogen umfassen eine heterologe Sequenz, wie etwa ein heterologes Protein, Polypeptid oder funktionell aktives Peptid, insbesondere ein Affinitätspeptid. Erfindungsgemäß ist die heterologe Sequenz so ausgewählt, daß sie eine hohe Affinität oder eine spezifische Bindungseigenschaft für eine funktionelle Gruppe eines Trägers besitzt. Das heterologe Protein oder Polypeptid sollte dabei ein immunologisch gut charakterisiertes Protein sein, gegen das beispielsweise Antikörper zur Kopplung an einen festen Träger zur Verfügung stehen. Erfindungsgemäß kann die Adsorption an den festen Träger z.B. durch kovalente Bindung oder über Affinität erfolgen. Die Proteine oder Polypeptide können dabei abgeleitet sein von z.B. β -Galaktosidase, c-myc-Produkt, Glutathion S-Transferase, Avidin und die Lysin-bindende Kringeldomäne von Plasmaproteinen, wie z.B. von Plasminogen (Evan et al. Mol. Cell. Biol. 5: 3610-3616, 1985; Duijnhoven et al., Hybridoma 11:71-86, 1992). Die funktionell aktiven Peptide, welche in der heterologen Sequenz liegen, können aus einer Anreihung von mehreren, gleichen oder verschiedenen Aminosäuren bestehen.

Eine bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein Fusionsprotein, dessen heterologer Sequenzanteil ein Peptid, das mit einem festen Träger eine kovalente Bindung eingehen kann, oder ein Poly-Histidin, das eine hohe Affinität insbesondere zu Schwermetallionen oder spezifischen anti-Poly-Histidin-Antikörpern besitzt, umfaßt.

Durch die C-terminale Deletion der cytoplasmatischen und transmembranen Region wird lösliches Furin oder Furinanalogen exprimiert, das aus den rekombinanten Zellen sekretiert wird. Gegebenenfalls kann bei dem Furinderivat oder dem Derivat des Analogons zusätzlich die Cystein-reiche Region deletiert sein. Die enzymatische Aktivität des deletierten Proteins ist erfindungsgemäß im Vergleich zum kompletten Protein im wesentlichen unverändert.

Unter einem Derivat eines Furinanalogen wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung jedes Furin-ähnliche Protein verstanden, das gleiche oder ähnliche biologische Aktivität wie Furin aufweist oder Sequenzhomologie zu Furin besitzt. Dies gilt in erster Linie für das mit Furin identische PACE, aber auch PACE4, PC1/PC3, PC2 und PC4 sind in die vorliegende Erfindung miteingeschlossen.

Es sollen aber auch alle weiteren durch Insertion, Deletion oder Austausch von Aminosäuren bzw. Nukleotiden aus Furin bzw. dem Furinanalogen generierten Proteine bzw. Nukleinsäuren, welche Furin-ähnliche biologische Aktivität haben, in den Rahmen der vorliegenden Erfindung fallen.

Fusionsproteine, bestehend aus einem deletierten Furinanteil und einer heterologen Sequenz, sind zwar im Stand der Technik beschrieben, diese bekannten Fusionsproteine eignen sich jedoch nicht zur Lösung der erfindungsgemäßen Aufgabe. So offensichtlich Duijnhoven et al. (Hybridoma 11:71-86, 1992) N-terminale Furin-deletionsmutanten fusioniert mit Glutathion S-Transferase. Ebenso wurde die Pre-Pro-Sequenz von PACE(Furin) an den N-Terminus der leichten Kette der bovinen Enterokinase fusioniert (LaVallie et al. J. Biol. Chem. 268:23311-23317, 1993). Fusionsproteine enthaltend ein sogenanntes FLAG Epitop-Tag, inseriert an das N-terminale Ende des katalytischen Zentrums des Furins nach Aminosäure Arg107, sowie murine Furinmutanten, bei denen der transmembrane und cytoplasmatische C-terminal nach Aminosäure 704 deletiert und durch ein Antikörper-Epitop des HSV Glykoproteins D ersetzt wurde, wurden ebenfalls beschrieben (Molloy et al. EMBO J. 13: 18-33, 1994; Matthews et al. Protein Science 3: 1197-1205, 1994). Diese Furinderivate wurden für die Detektion von Furin während seiner Reifung und Prozessierung im Golgi-Apparat oder zur Detektion von furinhaltigen Zellkulturüberständen mittels Immunblot eingesetzt und sind zur biotechnologischen Anwendung für die Zwecke der vorliegenden Erfindung, insbesondere zur Spaltung von pro-vWF in vWF, in vitro ungeeignet. Solche Furinderivate sollen daher nicht in den Rahmen der vorliegenden Erfindung fallen.

Gemäß einem besonderen Aspekt der vorliegenden Erfindung besteht das Fusionsprotein aus einem Furin-Derivat, dessen C-terminale cytoplasmatische und transmembrane Domäne und gegebenenfalls Cystein-reiche Region deletiert und durch ein Affinitätspeptid ersetzt worden ist. Dabei wurde ein Furinderivat oder ein Derivat eines Furinanalogen mit einem funktionellen Peptid, insbesondere aus mehreren Histidin-Resten, vorzugsweise aus 3 bis 20 Histidin-Resten, besonders bevorzugt aus 6 bis 15 aufeinander folgenden Histidin-Resten, fusioniert. Die Verwendung von C-terminal an ein Protein fusionierten Affinitätspeptiden in Form von Poly-Histidin-Resten (sogenanntes "His-Tag") zur Reinigung und/ oder zu Funktionsstudien von Proteinen wurde beschrieben (Janknecht et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8972-8976, 1991, Hoffmann et al., Nucleic Acids Res 19:6337-6338, 1991, EP 0 282 042).

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wurde ein Furinderivat mit deletierter cytoplasmatischer und transmembraner Region mit einem Peptid aus mehreren Histidin-Resten fusioniert. Gemäß einer besonderen Ausführungsform ist Furin derart modifiziert, daß die für den transmembranen und cytoplasmatischen Teil kodierenden Sequenzen (Aminosäure 708 bis 794) deletiert (rFurin Δ TM) und nach der Aminosäure 707 die kodierende

Sequenz für sechs Histidin-Reste angehängt werden. Das so erhaltene Fusionsprotein wurde mit rFurin Δ TM-His bezeichnet.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft ein Fusionsprotein, bei dem ein Furinderivat oder Derivat eines Furinanalogs mit deletiertem transmembranen und cytoplasmatischen Teil sowie der Cystein-reichen Region mit einem Affinitätspeptid aus mehreren Histidin-Resten fusioniert wurde.

In einer bevorzugten Ausführungsform wurde ein Furinderivat, bei dem neben der transmembranen und cytoplasmatischen Domäne die Cystein-reiche Region nach Aminosäure 585 deletiert war, mit sechs Histidin-Resten fusioniert. Dieses Fusionsprotein wurde mit rFurin Δ Cys-His bezeichnet.

Die Fusion eines Furinderivats oder eines Derivats eines Furinanalogs mit einer heterologen Sequenz soll gemäß der vorliegenden Erfindung so ausgeführt sein, daß die katalytische Funktion des Furins oder Furinanalogen im wesentlichen nicht beeinträchtigt wird.

Gemäß einem besonderen Aspekt der vorliegenden Erfindung wird daher zwischen die Sequenz des Furinderivats oder eines Derivats eines Furinanalogs und die heterologe Sequenz ein kurzer Peptid-Spacer inseriert, um das katalytische Zentrum des Furinderivats sterisch nicht zu behindern.

Dies ist insbesondere dann von Vorteil, wenn eine direkte Fusion der Cystein-reichen Region des Furinderivats mit einem Peptid die enzymatische Aktivität des Furinderivats beeinträchtigt, die Kopplung an den Träger durch chemische oder sterische Wechselwirkungen behindert oder mit einer effizienten Prozessierung des Pro-Proteins interferiert. Dieser kurze Peptid-Spacer, der vorzugsweise aus 5 bis 15 Aminosäuren besteht, ist im speziellen aus kleinen, flexiblen Aminosäuren, wie Alanin oder Glycin, zusammengesetzt. In einer besonderen Ausführungsform wird zwischen die Furin-kodierende Sequenz und die heterologe Sequenz von 6 Histidin-Resten ein Spacer bestehend aus Ala-Ala-Gly-Gly-Ala-Ala inseriert. Die so entstandenen Fusionsproteine wurden mit rFurin Δ TM-Spacer-His und rFurin Δ Cys-Spacer-His bezeichnet.

Das erfindungsgemäße Fusionsprotein weist über seinen Protein-, Polypeptid- oder Peptidanteil spezifische Bindungseigenschaften zu einem festen Träger auf. Als feste Träger können dabei Träger mit (Schwer)Metallionen, wie zwa Ni²⁺, Co²⁺, Mg²⁺, Li²⁺ oder mit Antikörpern eingesetzt werden.

Gemäß einem besonderen Aspekt der vorliegenden Erfindung wird das Fusionsprotein durch seine Bindung an den festen Träger immobilisiert. Bevorzugterweise wird das erfindungsgemäße Fusionsprotein mit einem heterologen Sequenzanteil bestehend aus mehreren Histidin-Resten aufgrund dessen Affinität zu (Schwer)-Metallionen, insbesondere zu Ni²⁺, oder zu spezifischen anti-Poly-Histidin-Antikörpern, gebunden.

In einer besonderen Ausführungsform werden die Konstrukte rFurin Δ TM-His, rFurin Δ Cys-His, rFurin Δ TM-Spacer-His und rFurin Δ Cys-Spacer-His über ihre Affinität zu Ni²⁺-Ionen, oder zu einem Antikörper an den Träger gebunden. Der feste Träger kann gemäß der vorliegenden Erfindung als Matrix zur Verfügung gestellt werden. Die Bindung an die Matrix erfolgt dabei über die affinen Gruppen des festen Trägers, so daß das Fusionsprotein frei zugänglich ist. Dies ist insbesondere dann von Vorteil, wenn das an den Träger immobilisierte Fusionsprotein für die proteolytische Spaltung von Pro-Proteinen eingesetzt wird und dieser Prozeß gebunden an einer Matrix erfolgt.

Als Matrix, an der der Affinitätsträger adsorbiert, können natürliche und synthetische Matrices, wie Sepharose, Agarose, Gelatine, Acrylate etc. verwendet werden. Die feste Matrix trägt je nach Versuchsansatz eine funktionelle Gruppe, die den Träger spezifisch binden kann.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die rekombinante DNA kodierend für die erfindungsgemäßen Fusionsproteine.

Zur Konstruktion der Fusionsproteine wird die kodierende Nukleotidsequenz von Furin oder einem Furinanalogen derart modifiziert, daß die kodierende Sequenz für den cytoplasmatischen und transmembranen Bereich, und gegebenenfalls für die Cystein-reiche Region deletiert wird (Van der Ven et al. 1993. Crit. Rev. Oncogen 4:115-136). Dies erfolgt durch aus dem Stand der Technik bekannte gentechnische Methoden, wie spezifischen Restriktionsverdau mit Endonukleasen, Ligation oder PCR. Die so hergestellten Deletionsmutanten werden dann mit einer heterologen Sequenz ebenfalls über bekannte Techniken, fusioniert.

Die erfindungsgemäßen Fusionsproteine können ebenfalls durch chemische Synthese hergestellt werden.

Die Fusionsproteine werden vorzugsweise durch rekombinante Expression hergestellt. Die gentechnische Herstellung kann mit allen gängigen eukaryontischen Expressionssystemen, wie z.B. permanenten Zelllinien oder viralen Expressionssystemen, erfolgen. Die permanenten Zelllinien werden hergestellt durch stabile Integration der Fremd-DNA in das Wirtszellchromosom z.B. Vero, MRC5, CHO, BHK, 293, Sk-Hepl, insbesondere Leber- und Nierenzellen, oder durch einen episomalen Vektor, abgeleitet von z.B. Papilloma Virus. Virale Expressionssysteme, wie Vaccinia Virus, Baculovirus oder retrovirale Systeme können ebenfalls eingesetzt werden. Als Zelllinien werden allgemein Vero, MRC5, CHO, BHK, 293, Sk-Hepl, Drüsen-, Leber- und Nierenzellen eingesetzt. Als eukaryotische Expressionssysteme können auch Hefen, endogene Drüsen (z.B. Drüsen transgener Tiere) und andere Zelltypen, die endogen Furin oder Furinanalogen exprimieren, verwendet werden. Natürlich können auch transgene Tiere zur Expression von Furin oder Derivaten davon verwendet werden. Zur Expression der rekombinanten Proteine haben sich im speziellen CHO-DUXS B11 Zellen bewährt (Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, 1980).

Zur rekombinanten Herstellung der erfindungsgemäßen Fusionsproteine können auch prokaryontische Expressionssysteme eingesetzt werden. Hierzu eignen sich insbesondere Systeme, die eine Expression in *E. coli* oder *B. subtilis* erlauben.

Die Fusionsproteine werden in den entsprechenden Expressionssystemen unter der Kontrolle eines geeigneten

5 Promotors exprimiert. Im Fall der Expression in Eukaryonten eignen sich dazu alle bekannten Promotoren, wie SV40-, CMV-, RSV-, HSV-, EBV-, β -Actin-, hGH oder induzierbare Promotoren wie z.B. hsp- oder Metallothionein-Promotor. Vorzugsweise werden die Fusionsproteine unter Kontrolle des β -Actin-Promotors in CHO-DUXS B11-Zellen exprimiert.

10 Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Fusionsprotein-Komplex enthaltend ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein und einen festen Träger zur Verfügung gestellt. Als feste Träger können dabei Träger mit Metallionen, wie etwa Ni^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , Li^{2+} oder Antikörper eingesetzt werden. Das Fusionsprotein bildet dabei mit dem Träger einen stabilen Komplex, wobei dieser Komplex gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung aus einer Lösung durch Bindung an eine Matrix entfernt werden kann. Die Bindung an die Matrix erfolgt dabei selektiv, wodurch keine weiteren Bestandteile der Lösung an das Trägermaterial gebunden werden.

15 In einer besonderen Ausführungsform wird der Fusionsprotein-Komplex dadurch erhalten, daß eine Fusionsprotein-haltige Lösung, vorzugsweise ein Zellkulturüberstand, mit einem festen Träger, gegebenenfalls gebunden an eine Matrix, in Kontakt gebracht wird, wodurch das Fusionsprotein spezifisch an den Träger adsorbierte. Das Fusionsprotein kann so selektiv aus der Lösung entfernt werden und das Fusionsprotein-freie Medium wieder zur Zellkultur zurückgeführt werden. Dies ist insbesondere deshalb von Vorteil, da während des Zellwachstums von den Zellen ausgeschiedene, wichtige Wachstumshormone dem Zellkultursystem wieder zur Verfügung gestellt und nicht durch Mediumwechsel 20 ausverdünnt werden. Gleichzeitig wird das mit dem Zellwachstum interferierende Fusionsprotein selektiv aus dem Medium entfernt und kann so das Zellwachstum nicht mehr negativ beeinflussen. Der so gewonnene Fusionsprotein-Komplex kann zur spezifischen in vitro-Spaltung von Pro-Protein zu Protein eingesetzt werden oder aber vom Träger wieder losgelöst und separat aufgearbeitet werden.

25 Ein anderer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Proteinen aus Pro-Proteinen, bei dem ein Pro-Protein durch ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein oder einen Fusionsprotein-Komplex proteolytisch gespalten wird.

30 Unter Pro-Proteinen sind hierbei sämtliche Vorstufen von Proteinen verstanden, welche durch geeignete proteolytische Behandlung in funktionelle Proteine umgewandelt werden können. Insbesondere können Pro-Proteine Pro-Enzyme, Prä-Pro-Enzyme oder andere (inaktive) Vorstufen von biochemisch (physiologisch) oder biotechnologisch verwendbaren Proteinen oder Enzymen sein.

35 Die erfindungsgemäße Herstellung von Proteinen aus Pro-Proteinen kann einerseits in an sich bekannter Weise durch Koexpression der kompletten kodierenden Sequenzen des Pro-Proteins mit dem erfindungsgemäßem Fusionsprotein in einer Zelle erfolgen. Da das erfindungsgemäßes Fusionsprotein insbesondere aufgrund der gegebenenfalls fließenden cytoplasmatischen und transmembranen Region im Furinanteil oder seinen Analogen als lösliches Protein aus der Zellen sezerniert wird, kann es nach Expression seine enzymatische Aktivität sowohl in der Zelle als auch im Zellüberstand ausführen. Damit ist gewährleistet, daß auch möglicherweise in den Überstand sezerniertes, unprozes-40 siertes Pro-Protein durch das lösliche Fusionsprotein gespalten wird und somit das Pro-Protein vollständig in seine mature Form überführt wird. Bei diesem Verfahren erfolgt die proteolytische Spaltung sowohl *in vivo*, also in den Zellen, als auch *in vitro*. Insbesondere die Spaltung *in vitro*, also außerhalb der Zellen, stellt aufgrund der löslichen Eigen-45 schaften des Fusionsproteins einen zusätzlichen Prozeß zur Spaltung von in den Überstand sezerniertem, unprozes- siertem Pro-Protein dar.

50 Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird das Pro-Protein durch das erfindungsgemäßes Fusionsprotein *in vitro* in das mature Protein gespalten. Bei der *in vitro*-Spaltung sind, im Gegensatz zur zuvor dargelegten *in vivo*-Spaltung keine lebenden Zellen mehr direkt oder indirekt involviert.

55 Gemäß einer besonderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung liegen beide Reaktionspartner, das Pro-Protein und das Fusionsprotein in Lösung vor. Die Lösung kann dabei ein zellfreier Kulturüberstand sein, bei denen das Pro-Protein und das Fusionsprotein zwar koexprimiert werden, das Pro-Protein jedoch erst im Zellüberstand vollständig in seine mature Form gespalten wird. Die Lösung kann jedoch auch ein Zellkulturüberstand von Zellen sein, bei denen Zellen transfiziert mit rekombinantem Fusionsprotein bzw. rekombinantem Pro-Protein kokultiviert werden und die exprimierten Proteine (bei *in vitro*-Anwendung: nach Abtrennung des Zellmaterials) im Zellkulturüberstand miteinander reagieren.

60 Gemäß einer weiteren Ausführungsform werden das Fusionsprotein und das Pro-Protein in separaten Zellkultursystemen exprimiert, gegebenenfalls gereinigt, und miteinander gemischt. Diese Ausführungsform erlaubt zum einen für das Pro-Protein eine höhere Expression im Vergleich zur Koexpression oder Kokultivierung, da der negative Effekt der Protease während des Zellwachstums entfällt, zum anderen eine höhere Ausbeute an prozessiertem Material nach der *in vitro*-Prozessierung.

65 Gemäß einem besonderen Aspekt der vorliegenden Erfindung wird das Fusionsprotein aus dem Zellkulturüberstand, unabhängig, ob es durch Koexpression oder separate Expression hergestellt wird, entfernt. Da lösliches Furin

auch im Zellkulturüberstand proteolytisch aktiv ist (Wasley et al., 1993, J. Biol. Chem. 268:8458-8465), schränkt, wie schon erwähnt, die Anwesenheit der Protease das effiziente Wachstum von kontinuierlich wachsenden Zelllinien ein. Die erfindungsgemäßen Fusionsproteine besitzen gemäß der vorliegenden Erfindung im wesentlichen die gleiche proteolytische Aktivität wie Furin oder Furinanaloge und interferieren daher ebenfalls mit dem Zellwachstum. Die Proteaseinwirkung auf die Zellen kann jedoch erfindungsgemäß durch Entfernen der Protease aus dem Zellkulturüberstand minimiert bzw. weitgehend verhindert werden, wodurch die Zellen normal wachsen können.

Aufgrund der spezifischen Bindungseigenschaften der erfindungsgemäßen Fusionsproteine mit einem festen Träger kann das Fusionsprotein durch In-Kontakt-bringen mit einem festen Träger aus der Fusionsprotein-haltigen Lösung entfernt werden.

Gemäß einem besonderen Aspekt der Erfindung wird der Zellkulturüberstand enthaltend das Fusionsprotein über eine feste Matrix gepumpt, an die der affine Träger spezifisch gebunden ist. Das Fusionsprotein-freie Medium wird anschließend wieder zur Zellkultur zurückgeführt. Das an den festen Träger gebundene Fusionsprotein wird dabei vorzugsweise in einem kontinuierlichen Prozeß aus dem Zellkulturüberstand entfernt. Besonders bevorzugt ist dabei ein kontinuierliches Verfahren, bei dem in vorgegebenen Zeitabständen ein Durchfluß des Zellüberstandes über eine Matrix erfolgt. Dadurch wird gewährleistet, daß bei ständiger Expression das Fusionsprotein in einem Komplex an den Träger gebunden wird, und das Fusionsprotein kontinuierlich aus der Lösung entfernt wird. Der toxische Effekt der Protease auf das Zellwachstum wird dadurch stark reduziert und die Zellen können zu größerer Dichte wachsen, was wiederum die Ausbeute an Expressionsprodukt erhöht. Gleichzeitig wird durch das beschriebene Verfahren eine Anreicherung des Fusionsproteins an einer Matrix erreicht, wodurch auch eine hohe Reinheit des Fusionsproteins gewährleistet ist. Ein besonderer Vorteil dieses Verfahrens ist damit die Gewährleistung von verbessertem Zellwachstum verbunden mit einer Anreicherung von reinem Fusionsprotein an einer Matrix. Die Matrix liegt vorzugsweise als Säulenmatrix vor. Die so hergestellte Säulenmatrix kann direkt für die Aktivierung von Pro-Proteinen zu Proteinen eingesetzt werden.

Prinzipiell kann das oben beschriebene Verfahren auch mit "shed furin"-Furin oder Furinanalogen durchgeführt werden, wobei das Furin oder das Furinanaloge über einen Antikörper gebunden wird, der die proteolytische Aktivität nicht beeinträchtigt.

Bei Zellkulturüberständen, die sowohl Fusionsprotein als auch vollständig prozessiertes Protein enthalten, wie etwa bei Koexpression oder Kokultivierung, kann, wie oben erwähnt, das Fusionsprotein durch Bindung an einen ersten festen Träger aus der Lösung entfernt und spezifisch isoliert werden. In einem zusätzlichen Schritt kann das schon prozessierte Protein durch Adsorption an einen zweiten, vom ersten verschiedenen Träger ebenfalls aus der Lösung isoliert werden. Der zweite Träger ist dabei so ausgewählt, daß er spezifische Bindungseigenschaften zum prozessierten Protein besitzt und unprozessiertes Pro-Protein nicht bindet. Als bevorzugte Träger werden Träger mit Antikörpern, Peptiden und Proteinen mit hoher Affinität zum aktiven Protein eingesetzt. Der Träger ist erfindungsgemäß an eine feste Matrix gebunden, die vorzugsweise als Säulenmatrix vorliegt. Die Reihenfolge der an eine Säulenmatrix gebundenen Träger ist gemäß dem beschriebenen Verfahren variabel. Die Kopplung der Säulen erfolgt vorzugsweise sequentiell, wobei die Reihung Fusionsprotein-bindende Säule → Protein-bindende Säule besonders bevorzugt ist. Dieses Verfahren bietet den Vorteil, daß beim Durchlauf der Fusionsprotein-, Pro-Protein- und Protein-haltigen Lösung eine spezifische Bindung an den jeweiligen Träger erfolgt und eine Protein- und Fusionsprotein-freie Lösung zurückgeführt wird. Durch dieses Verfahren können damit auch bei der Koexpression und Kokultivierung von Fusionsprotein-exprimierenden Zellen höhere Zeldichten erreicht werden. Gleichzeitig wird eine Anreicherung sowie Isolierung von zwei verschiedenen, wichtigen Proteinen in einem einzigen Verfahrensschritt erreicht. Es ist zu betonen, daß dieses Verfahren nicht nur mit Furin-Fusionsproteinen durchführbar ist, sondern auch mit Wildtyp-Furin oder bekannten Furin-Mutanten, welche Furin-Aktivität aufweisen, indem diese Proteine an eine feste Matrix gebunden werden.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung erfolgt die Durchführung der proteolytischen Spaltung des Pro-Proteins zum Protein in vitro derart, daß einer der Reaktionspartner, das Pro-Protein oder das Fusionsprotein, immobilisiert ist.

Dabei kann das Pro-Protein an einem festen Träger immobilisiert sein und eine Lösung enthaltend das Fusionsprotein mit dem Pro-Protein in Kontakt gebracht werden. Gemäß einer Ausführungsform werden für das erfindungsgemäßige Verfahren Lösungen enthaltend gereinigtes Fusionsprotein eingesetzt. Dazu werden die Proteine mittels gentechnischer Methoden in transfizierten Zellen separat exprimiert, die Proteine aus dem Überstand gereinigt, in Puffer gelöst und anschließend die proteinhaltigen Pufferlösungen miteinander in Kontakt gebracht. Die Reinigung der Proteine erfolgt dabei mit aus dem Stand der Technik allgemein bekannten Methoden wie Gelfiltrations-, Ionenaustauscher- oder Affinitätschromatographie.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist das Fusionsprotein an einem festen Träger immobilisiert und das Pro-Protein liegt in Lösung vor. Bei diesem Verfahren wird ein an eine Säulenmatrix adsorbierter Fusionsprotein-Komplex, enthaltend ein Fusionsprotein gebunden an einen Träger, mit einer Pro-Protein-haltigen Lösung, in vitro in Kontakt gebracht.

Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens eignen sich alle inaktiven Vorstufen eines Proteins, das

durch die Aktivität von Furin oder eines Furin-ähnlichen Proteins in seine reife oder aktive Form überführt wird. In die vorliegende Erfindung sind daher insbesondere inaktive Vorstufen von Blutfaktoren oder von viralen Proteinen als Protein eingeschlossen, wobei jedoch keine Einschränkung auf diese erfolgt. Die Plasmaproteine sind insbesondere ausgewählt aus Faktor IX, von Willebrand-Faktor, Faktor VII, Faktor X, Faktor XI, Faktor V, Protein C, Protein S und 5 Albumin oder Derivate davon. Mögliche virale Proteine oder Polypeptide sind solche von CMV, HDV HCV, HSV, HIV wie gp160 oder Influenza-Virus wie HA-Protein (Klenk et al., 1994, Cellular Receptors for Animal Viruses.CSH Laboratory Press. 241-280). Die Proteine sind vorzugsweise durch gentechnische Verfahren hergestellt. Jede Vorstufe eines Polypeptids mit mindestens einer dibasischen Spaltstelle ist jedoch ein Kandidat für das vorliegende Verfahren.

Beim erfindungsgemäßen Verfahren liegt die in vitro-Kontaktdauer zwischen Pro-Protein und Fusionsprotein zwischen einigen Sekunden und mehreren Tagen. Der optimale Kontakt ist abhängig vom verwendeten Fusionsprotein oder Fusionsproteinderivat und der inaktiven Pro-Protein-Vorstufe. Die Bestimmung der optimalen Kontaktzeit, bei der Pro-Protein vollständig zu Protein gespalten wird, kann jedoch von jedem Fachmann mittels einfacher Versuche erfolgen. Die Inkubation erfolgt meist bei einer Temperatur zwischen 4°C und 42°C, vorzugsweise zwischen 20°C und 10 38°C. Die Reaktion erfolgt bei einem pH-Wert von 5,0 bis 8,0, vorzugsweise bei einem pH-Wert von 6,5 bis 7,9, und 15 insbesondere bei einem pH-Wert von 7,1. Aufgrund der Ca²⁺-Abhängigkeit der Furin- oder Furinanalogen-Aktivität werden üblicherweise zur Durchführung des Verfahrens solche Puffer eingesetzt, die Ca²⁺-Ionen beinhalten.

Die Reaktionsbedingungen für die Aktivierung von Pro-Protein durch das Fusionsprotein können, sofern einer der Reaktionspartner immobilisiert ist, ohne weiteres vom Fachmann je nach Versuchsanordnung innerhalb der gegebenen Rahmenbedingungen optimiert werden. Dabei ist für die Kontaktzeit als Variable die Fließgeschwindigkeit des in 20 Lösung vorliegenden Reaktanden von besonderer Bedeutung. Diese sollte zwischen 0,05 ml/min und 1 ml/min liegen. Als weitere Parameter sind Temperatur, pH-Wert und Salzkonzentration von Bedeutung. Zur vollständigen Aktivierung von Pro-Protein können gemäß dem vorliegenden Verfahren mehrere Säulen hintereinander geschaltet, wobei entweder Pro-Protein oder Fusionsprotein an einen Träger immobilisiert sind. Nach jedem Durchlauf kann das bereits 25 prozessierte Protein von seinem Propeptid abgetrennt und über selektive Chromatographie weiter gereinigt werden.

Die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens mit einem an einen Träger gebundenen Reaktionspartner ist deshalb von besonderem Vorteil, da die Reaktionsanordnung durch Verwendung eines Trägers, vorzugsweise einer Chromatographiesäule, einen zusätzlichen Reinigungsschritt ermöglicht.

Das gemäß dem vorliegenden Verfahren prozessierte, aktive Protein wird aus dem Reaktionsgemisch gereinigt und seine Aktivität mit aus dem Stand der Technik bekannten Methoden bestimmt.

Vor der Aufbereitung in eine pharmazeutische Präparation wird isoliertes und gereinigtes prozessiertes Protein 30 den üblichen Qualitätskontrollen unterzogen und in eine therapeutisch verabreichbare Form gebracht.

Daher betrifft die Erfindung auch eine pharmazeutische Präparation enthaltend ein gemäß dem erfindungsgemäß 35 Ben Verfahren hergestelltes Protein.

In der Fachwelt galt es bisher als unmöglich pro-vWF in vitro mit Furin zu aktivem vWF zu prozessieren (Rehementulla et al., 1992, Blood 79:2349-2355, Rehementulla et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 89:8235-8239).

Es hat sich überraschenderweise herausgestellt, daß pro-vWF-entgegen der Lehrmeinung- unter bestimmten Ver- 40 suchsbedingungen durch Furin in vitro zu vWF prozessiert wird.

Ein besonderer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist daher, daß pro-vWF als Pro-Protein mit dem erfindungsgemäß Fusionsprotein, vorzugsweise Furin Δ TM-Spacer-His, in Kontakt gebracht wird. In einem Aspekt werden pro-vWF und Fusionsprotein in Lösung in Kontakt gebracht. Die Lösungen sind vorzugsweise Zellkulturüberstände von 45 rekombinanten Zelllinien oder Lösungen, die gereinigte Proteine enthalten.

Gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden Zellkulturüberstände von transzitierten Zellen, die pro-vWF bzw. das erfindungsgemäß Fusionsprotein exprimieren, gemischt. Die Zellkulturüberstände können gegebenenfalls "roh" verwendet werden, das heißt, daß die transzitierten Zellen nicht vom Überstand abgetrennt und die jeweiligen Proteine nicht gereinigt werden. Vorzugsweise werden die Zellüberstände jedoch vor dem In-Kontakt-bringen derart aufgereinigt, daß die Zellen bzw. Zellfragmente durch Zentrifugation vom Überstand abgetrennt werden und gegebenenfalls die Proteine grob gereinigt und aufkonzentriert werden. Dies kann durch allgemein aus dem Stand der Technik bekannten Methoden, wie z.B. Ultrafiltration, Ammoniumsulfatfällung und anschließende Dialyse oder 50 Filtration, erfolgen.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform werden für das erfindungsgemäß Verfahren Lösungen enthaltend gereinigten pro-vWF und Fusionsprotein eingesetzt.

Ein weiterer Aspekt des erfindungsgemäß Verfahrens ist die Kokultivierung von Zellen, die pro-vWF einerseits und Fusionsprotein andererseits exprimieren. Bei diesem Verfahren wird pro-vWF im Zellkulturüberstand von dem ebenfalls im Zellkulturüberstand anwesenden Fusionsprotein in vitro in seine aktive Form gespalten und prozessierter vWF und Fusionsprotein werden anschließend, wie oben beschrieben, aus dem Reaktionsgemisch isoliert und gereinigt. Für die Kokultivierung können alle gängigen Expressionssysteme eingesetzt und verschiedene Systeme zur Expression von pro-vWF und Fusionsprotein miteinander kombiniert werden. Bevorzugt wird allerdings ein Expressionssystem eingesetzt, bei dem sowohl pro-vWF als auch Fusionsprotein in verschiedenen Zelllinien desselben Ursprungs

exprimiert werden. Dabei werden vorzugsweise CHO-Zellen eingesetzt.

In einem weiteren Aspekt der Erfindung ist einer der Reaktionspartner, pro-vWF oder Fusionsprotein an einem Träger immobilisiert.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist pro-vWF an einem Träger immobilisiert und das Fusionsprotein liegt in Lösung vor. Für pro-vWF eignen sich in besonderer Weise Träger, die entweder pro-vWF über Antikörper oder über spezifische Liganden, wie z.B. Kollagen oder platelet-protein-gplb, gpllb/llla-Komplex, Faktor VIII-Fragmente, Heparin, Ristocetin oder Botrocetin binden. Die eingesetzten Antikörper können polyklonal oder monoklonal sein und entweder gegen das Propeptid des vWF oder gegen die reife Form des vWF gerichtet sein. Ist der Antikörper gegen das vWF-Propeptid gerichtet, so wird prozessierter vWF nach Kontakt mit dem Fusionsprotein vom Träger eluiert. Ist der Antikörper gegen maturen vWF gerichtet, so wird durch Kontakt mit dem Fusionsprotein das Propeptid abgespalten und aus dem Reaktionsgemisch entfernt. Der am Träger gebundene, prozessierte vWF kann anschließend mit bekannten Methoden von der Säule eluiert werden. Bei dieser Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens erreicht man durch den Elutionsschritt zudem eine zusätzliche Reinigung und Anreicherung des vWF.

In einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird das Fusionsprotein an eine Matrix auf einem Träger mit Antikörpern oder Schwermetallionen gebunden. Die Antikörper können polyklonal oder monoklonal sein. Dabei werden in der Regel nur solche Antikörper eingesetzt, die die proteolytische Aktivität des Fusionsproteins nicht beeinträchtigen.

In einer besonderen Ausführungsform ist das Fusionsprotein über einen Träger mit Metallionen an die Matrix gebunden. Als Metallionen können dabei etwa Ni^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} oder Li^{2+} eingesetzt werden.

Die Immobilisierung des pro-vWF oder des Furins oder seiner Derivate erfolgt mit in der Proteinchemie gängigen Verfahren.

Der nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhaltene prozessierte, mature vWF wird aus dem Reaktionsgemisch gereinigt und seine Aktivität mit aus dem Stand der Technik bekannten Methoden bestimmt (Baruch et al., 1989, Bailleul's Clinical Haematology 2:627-672).

Vor der Aufbereitung in eine pharmazeutische Präparation wird isolierter vWF den üblichen Qualitätskontrollen unterzogen, aufkonzentriert und in eine therapeutisch verabreichbare Form gebracht.

Des Weiteren betrifft die Erfindung einen rvWF, der nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt wird und eine pharmazeutische Präparation, die rvWF und einen oder mehrere physiologisch akzeptable Träger enthält. Es wurde gefunden, daß der nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellte, pro-Peptid-freie rvWF sich durch eine besonders hohe Stabilität und strukturelle Integrität der rvWF-Multimere auszeichnet und keine Satellitenbanden aufweist. Dieser rvWF eignet sich daher für die Stabilisierung von Faktor VIII, rekombinantem Faktor VIII oder funktionellen Deletionsmutanten von Faktor VIII sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Die pharmazeutische Präparation enthaltend pro-Peptid-freien rvWF besitzt hohe Stabilität sowie strukturelle Integrität der rvWF-Multimere und eignet sich daher besonders für die Behandlung von Hämophilie A und verschiedener Formen der vWF-Disease.

Ein besonderer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens ist, daß pro-vWF fast vollständig in seine reife Form gespalten wird. Erfindungsgemäß wird *in vitro*-prozessierter vWF in einer Reinheit von 80% bis 100%, vorzugsweise von 90% bis 100%, besonders bevorzugt 95% bis 100% erhalten. Eine Verunreinigung von vWF durch pro-vWF ist vor allem in Hinblick auf den Einsatz in der Therapie zu vermeiden, da ein mit pro-vWF verunreinigter rvWF, eine geringere spezifische Aktivität bzw. eine erhöhte Immunogenität aufweisen könnte. Das erfindungsgemäße Verfahren hat den zusätzlichen Vorteil, daß die proteinchemische Abtrennung von pro-vWF von vWF, insbesondere im Fall der Immobilisierung eines Reaktionspartners an eine Chromatographiesäule, erleichtert wird.

Bei hoher Amplifikation oder zu hoher Expression übt das Furin einen negativen Effekt auf die Zelle aus. Dieser Effekt kann minimiert werden, indem das produzierte Furin oder Fusionsprotein kontinuierlich aus dem Zellüberstand entfernt wird. Dies kann z.B. durch Furin-spezifische Chromatographie entweder im Batch- oder im Säulen-Verfahren erfolgen. Das in den Überstand sekretierte Furin oder Fusionsprotein wird dabei an einen chromatographischen Träger gebunden und der Träger mit immobilisiertem Furin kann dann gegebenenfalls direkt zur Pro-Protein-Spaltung eingesetzt werden.

Wenn eine große Menge von sekretiertem Furin oder Furinderivat gewonnen werden soll, besteht eine weitere Möglichkeit, die Toxizität von Furin auf die exprimierenden Zellen zu minimieren, darin, ein natürliches (Pro-Protein) oder ein synthetisches (Peptid-) Substrat mit Furin oder Fusionsprotein zu koexprimieren oder dem Zellkulturüberstand als Supplement zuzugeben. Ein Substrat kann dabei auch ein an Furin oder das Fusionsprotein reversibel bindendes, jedoch davon nicht spaltbares Peptid oder Protein sein, das die katalytische Aktivität des Furins oder Fusionsproteins verringert oder unterbindet, solange es mit Furin oder Fusionsprotein interagiert. Durch das zusätzliche Pro-Protein bzw. synthetische Substrat kann überschüssiges Furin bzw. Fusionsprotein, das unspezifisch innerhalb oder außerhalb der Zelle endoproteolytisch aktiv ist, abgefangen werden, und die Zellen nicht mehr schädigen. Das durch die hohe Expression synthetisierte Furin oder Fusionsprotein wird mit hoher Effizienz in den Zellüberstand sekretiert und kann anschließend aus dem Zellüberstand gereinigt werden.

Es ist daher ein besonderer Vorteil des Verfahrens, daß durch verschiedene, oben erwähnte Maßnahmen, die für

die Zelle hohe Toxizität bedingt durch große Mengen an exprimiertem Furin oder Fusionsprotein reduziert wird, wodurch der Produktionsablauf bei Herstellung von großen Mengen an Furin oder Fusionsprotein und Pro-Protein wesentlich erleichtert bzw. effizienter gestaltet wird, da erstens eine höhere Zelldichte erreicht wird, zweitens in einer geringeren Zeitspanne eine höhere Ausbeute an sekretiertem Furin erreicht wird und drittens eine vollständige Prozessierung von Pro-Protein gewährleistet ist.

5 Die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird im folgenden näher beschrieben:

Zur Durchführung der Experimente wurden CHO-Zellen mit einem pro-vWF-kodierenden Plasmid und mit einem Dihydrofolat-Reduktase (DHFR)-cDNA-kodierenden Plasmid kotransfiziert. Das DHFR-kodierende Plasmid diente dabei als Markerplasmid zur Selektion positiver Klone (CHO-vWF). Der daraus resultierende Klon, CHO-vWF, wurde für 10 die Koexpression mit Furin anschließend mit Plasmiden, die die Furin-cDNA bzw. cDNA kodierend für Fusionsproteine und das Neomycin-Phosphotransferase-Gen tragen, kotransfiziert. Das Neomycin-Phosphotransferase-Gen diente ebenfalls als Marker für die Selektion positiver Klone (CHO-vWF/Furin). Zur Expression von Furin oder Fusionsprotein alleine wurden Zellen mit Plasmiden enthaltend komplett Furin-cDNA oder cDNA der Fusionsproteine (Furin Δ TM-His-cDNA, Furin Δ TM-Spacer-His-cDNA, Furin Δ Cys-His-cDNA, Furin Δ Cys-Spacer-His-cDNA) transfiziert.

15 Ein anderer Ansatz zum Etablieren pro-vWF/Furin-koexprimierender Zellen war die gleichzeitige Kotransfektion von 3 Plasmiden, die respektive pro-vWF-cDNA, DHFR-cDNA und Furin- oder Fusionsprotein-cDNA enthalten. Durch diesen Ansatz wurde eine Koamplifikation von pro-vWF- und Furin-cDNA ermöglicht, um eine unter den gegebenen Umständen möglichst hohe Ausbeute an vollständig prozessiertem vWF zu erreichen.

20 Für die Kokultivierung wurden Zellen mit Plasmiden, die entweder die kodierende Sequenz von pro-vWF und DHFR, oder für Furin bzw. Fusionsprotein und DHFR enthalten, kotransfiziert. Die unterschiedlich transfizierten Zellen wurden anschließend gemeinsam kultiviert.

25 Das erfindungsgemäße Verfahren wird in folgenden Beispielen sowie in den Zeichnungsfiguren weiter erläutert. Die Erfindung soll jedoch in keiner Weise darauf beschränkt sein. Beispiel 1 beschreibt die Herstellung von pro-vWF- und Furin-exprimierenden Vektoren; Beispiel 2 beschreibt die Etablierung von stabilen Zelllinien und zeigt die in vitro-Spaltung von pro-vWF durch Furin; Beispiel 3 skizziert die Klonierung von Furinmutanten und Fusionsproteinen; Beispiel 4 beschreibt den Nachweis der enzymatischen Aktivität von Furin und Fusionsprotein rFurin Δ TM-His; Beispiel 5 beschreibt die Immobilisierung eines Fusionsprotein an einem Träger; und Beispiel 6 beschreibt die Aktivierung von pro-vWF an immobilisiertem Fusionsprotein.

30 Es zeigen:

Figur 1: Figur 1: Schematische Darstellung der Expressionskassette von pro-vWF, Furin und der verwendeten Selektionsmarker Dihydrofolat-Reduktase und Neomycin-Phosphotransferase.

35 Figur 2: Western-Blot-Analyse von prozessiertem vWF und Furin in Zellkulturüberständen nach Koexpression von pro-vWF und Furin.

Figur 3: Western-Blot-Analyse von Zellkulturüberständen auf rvWF und Nachweis der in vitro-Spaltung von pro-vWF durch Furin.

40 Figur 4: Nukleotid- und Aminosäuresequenz von Furin.

Figur 5: Western-Blot-Analyse von rFurin Δ Cys-Spacer-10XHis mit anti-Furin monoklonalen Antikörpern.

45 Figur 6: Silberfärbung und Western-Blot-Analyse von gereinigtem rFurin-Fusionsprotein.

Figur 7: Western-Blot-Analyse von mittels gereinigtem rFurin-Fusionsprotein prozessiertem vWF.

Figur 8: Schematische Zeichnung des Expressionsvektors phAct-rFX.

50 Figur 9: Western-Blot-Analyse von rFaktor X exprimiert in CHO-Zellen vor und nach Amplifikation mit Methotrexat und

Figur 10: Western-Blot-Analyse von rFaktor X nach in vitro-Spaltung durch rFurin-Fusionsproteine.

55 Die Expressionsvektoren wurden mittels Standard-Klonierungs-Methoden (Maniatis et al., "Molecular Cloning" - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA, 1983) hergestellt. Die Herstellung von DNA-Fragmenten mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) erfolgte durch allgemein bekannte Methoden (Clackson et al., 1991, PCR A practical approach. Ed. McPherson, Quirke, Taylor, S.187-214).

Beispiel 1:**Herstellung von pro-vWF und Furin Expressionsvektoren**

5 Zur Herstellung von rekombinantem pro-vWF (rpro-vWF) wurde Plasmid phAct-vWF wie in Fischer et. al., (FEBS Lett. 351: 345-348, 1994) beschrieben, konstruiert: Plasmid phAct-vWF enthält die komplette kodierende cDNA für humanen pro-vWF unter transkriptioneller Kontrolle des β -Actin-Promotors. Zur Selektion von positiven Klonen wurde Plasmid pSV-rdhfr, das für die murine DHFR-cDNA kodiert, eingesetzt (Figur 1).

10 Zur Herstellung von Furin-kodierenden Vektoren wurde die komplette cDNA von humanem Furin (Figur 4), (Van den Ouweland et al., Nucleic Acids Res. 18:664, 1990) als SmaI/AvrII-Fragment isoliert. Dieses Fragment umfaßt die 2,4 kb Furin-kodierende Region, sowie 0,05 kb der 5' nicht-translatierten und 0,4 kb der 3' nicht-translatierten Region und wurde anschließend in den mit SmaI und AvrII geschnittenen Expressionsvektor pSV-MCS VII kloniert. Das resultierende Plasmid wurde mit pSV-rFurink bezeichnet (Figur 1).

15 Plasmid pSV-MCS VII umfaßt den Promotor/Enhancer der "frühen Gene" von SV40 und 50bp der 5'-UTR, sowie das SV40 16S/19S Intron und eine "Multiple Cloning Site" (MCS), gefolgt von der SV40-Polyadenylierungsstelle. Zur Herstellung von Plasmid pSV-MCS VII wurde Plasmid pSV β (MacGregor et al., Nucleic Acids Res. 17: 2365, 1989) mit NotI geschnitten und die lacZ-Gensequenz als NotI-Fragment entfernt. Das 3'-seitig der SV40-Polyadenylierungsstelle befindliche XbaI/HindIII-Fragment wurde entfernt, die überstehenden Enden mit Klenow-Polymerase aufgefüllt und das Plasmid religiert. In die singuläre NotI-Restriktionsschnittstelle wurde eine synthetische MCS mittels NotI-kompatibler Enden kloniert und dadurch die NotI-Stelle zerstört. Die zu inserierende MCS wurde durch die beiden synthetischen, komplementären Oligonukleotide #256 (5'-GGCCATCGAT TGAATTCCCC GGGGTCCTCT AGAGT-CGACC TGCAGAAGCT TAGTACTAGT AGGCCTAGGG CCCTA-3') (SEQ.ID. NO. 1) und #257 (5'-GGCCTAGGGC CCTAGGCCTA CTAGTACTAA GCTTCTGCAG GTCGACTCTA GAGGACCCCCG GGGATTCAA TCGAT-3') (SEQ.ID. NO. 2) konstituiert.

20 25 Plasmid pUCSV-neo wurde hergestellt, indem die SV40-neo-Expressionskassette aus pMAMneo (Lee et al., 1981, Nature 294:228-232) als BamHI-Fragment in die BamHI-Restriktionsstelle von pUC19 (Yanisch-Perron et al., 1985, Gene 33:103-119) inseriert wurde.

Beispiel 2:

30 a. **Etablierung stabiler rvWF- und rvWF/rFurin-exprimierender Zelllinien und Expression von rvWF und rFurin**

35 Das Expressionsplasmid für rvWF, phAct-vWF (Figur 1), wurde mit dem Selektionsmarkerplasmid pSV-rdhfr (Figur 1) in dhfr-defiziente CHO-Zellen cotransfiziert, unter Selektionsbedingungen der effizient pro-rvWF-exprimierende Klon CHO-rvWF ausgewählt und dieser Klon bis zur Stabilität subkloniert (Fischer et al. 1994, Febs Lett.351:345-349). Zur weiteren Analyse und für rvWF-Expressions- und Funktionsstudien wurden die Zellen zunächst mehrmals mit PBS gewaschen, und anschließend, wenn nicht anders beschrieben, bei regelmässigen 24-Stunden-Medienwechseln in Selektionsmedium ohne Serum inkubiert.

40 45 In den Zellüberstand von CHO-rvWF sekretierter rvWF war zu etwa 40% unprozessiert (Figur 2 II A). Um die Effizienz der Propeptid-Abspaltung zu erhöhen, wurde im folgenden der rFurin-Expressionsvektor pSV-rFurink mit dem Selektionsmarker-Plasmid pUCSV-neo in den CHO-rvWF-Zellklon cotransfiziert. Unter Selektionsbedingungen (500 μ g G418/ml) wurden Klone identifiziert, die neben rvWF auch rFurin exprimieren (CHO-rvWF/rFurin; Figur 2 I A, B).

Der Nachweis von rvWF im Zellkulturüberstand erfolgte mittels Western-Blot Analyse (Figur 2 I A und II A). Dazu wurden 10 μ l reduzierter Zellkulturüberstand mittels SDS-PAGE (Lämmli, Nature 227:680-685, 1970) aufgetrennt, und die Proteine anschließend mit dem BioRad Mini Trans-Blot System (BioRad Laboratories, Richmond, CA, USA) auf Nitrozellulose-Membranen transferiert. Zur Visualisierung von den Zellkulturüberstand sekretiertem rvWF wurde das Protoblot-System der Fa. Promega (Madison, WIS, USA) verwendet. Als Antikörper zur vWF-Bindung wurde Kaninchen Anti-vWF Serum (Best. No. A 082) der Fa. Dakopatts (Glostrup, Dänemark) eingesetzt.

50 55 Der Nachweis von rFurin im Zellkulturüberstand erfolgte ebenfalls mittels Western-Blot Analyse (Figur 2 I B und II B). Die Visualisierung von rFurin erfolgte unter Verwendung des anti-hFurin Maus monoklonalen Antikörpers MON 148 (van Duijnhoven et al., Hybridoma 11: 71-86, 1992) und als zweitem Antikörper anti-Maus IgG-alkalische Phosphatase-konjugiertes Ziegenserum (Sigma A 4656).

In 24-Stunden-Zellkulturüberständen von CHO-rvWF-Zellen waren noch etwa 40% des sekretierten rvWF Propeptid-haltiger pro-vWF (Figur 2 II A), wogegen unter identischen Bedingungen in 24 Stunden-Überständen des CHO-rvWF/rFurin-Klons kein pro-vWF, sondern nur vollständig prozessierter rvWF detektiert wurde (Figur 2 I A). Hieraus folgt somit, daß in serumfreien 24-Stunden-Zellkulturüberständen kein pro-rvWF mehr nachgewiesen werden konnte, wenn die Zellen ausreichende Mengen rFurin exprimieren (Figur 2 I A, 1, 3, 4, 5). Durch die zusätzliche Expression von rFurin in CHO-rvWF konnte die Prozessierung von pro-rvWF zu vWF deutlich verbessert werden (Figur 2 I A).

Dieser Effekt wurde bisher ausschließlich auf die intra-zelluläre Aktion des durch Koexpression hergestellten rFurins zurückgeführt (Wise et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 87:9378-9382, 1990; Van de Ven et al. Mol. Bio. Rep. 14: 265-275, 1990; Rehemtulla et al., Blood 79:2349-2355, 1992).

Erfolgte bei Koexpression von pro-vWF und Furin ein häufigerer Mediumwechsel innerhalb von 24 Stunden (alle 5 Stunden), so konnten jedoch auch in Zellkulturüberständen von serumfrei gezüchteten CHO-rvWF/rFurin-Zellen 8 Stunden), so konnten jedoch auch in Zellkulturüberständen von serumfrei gezüchteten CHO-rvWF/rFurin-Zellen signifikante Mengen von pro-rvWF nachgewiesen werden (Figur 2 I A; "8 Stunden"). In den Überständen der CHO- 10 signifikante Mengen von pro-rvWF nachgewiesen werden (Figur 2 I A; "8 Stunden"). In den Überständen der CHO- rFurin-Zellen war rFurin detektierbar (Figur 2 I B); je größer die detektierbare rFurin-Menge im Überstand war, umso geringer war die Menge an pro-vWF (Figur 2 I A). Eine Erklärungsmöglichkeit - die jedoch im krassen Gegensatz 15 zur vorherrschenden Lehrmeinung (Rehemtulla et al., 1992, Blood 79: 2349-2355, Rehemtulla et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:8235-8239) steht - ist, daß durch Überexpression in den Zellkulturüberstand gelangtes rFurin erst 20 dort, d.h. in vitro, sekretierten pro-rvWF bis zur Vollständigkeit spaltet. Die durch den 8stündigen Medienwechsel kürzere Expositionszeit von pro-rvWF im Überstand zum ebenfalls in den Überstand sekretierten rFurin war daher nicht ausreichend, um alle im Überstand vorhandenen pro-vWF-Moleküle zu prozessieren; dagegen konnte bei längeren 25 Verweilzeiten (24 Stunden) sekretiertes rFurin im Überstand akkumulieren, so daß im Laufe der rFurin-Akkumulation immer mehr der zunächst im Überstand angesammelten pro-rvWF Moleküle prozessiert wurden. In der Folge wurde dann durch die Akkumulation immer größerer Mengen von rFurin weiterhin in den Überstand gelangter pro-rvWF dort sofort nach Ausschleusen aus der Zelle prozessiert. Während bei 8 Stunden-Überständen das Furin:pro-vWF-Verhältnis noch stärker auf Seiten des pro-vWF liegt, hat sich die Situation bei den 24 Stunden-Überständen aufgrund der Akkumulation von rFurin umgekehrt.

Gemäß dem vorliegenden Beispiel wurde rFurin im Überstand von CHO-rvWF/rFurin-Zellen mit Hilfe von Western Blot-Analyse und anti-hFurin monoklonalem Antikörper eindeutig nachgewiesen (Figur 2 I B). Dabei korrelierte der Prozessierungsgrad von pro-rvWF mit der detektierbaren Menge an rFurin im Überstand: je mehr rFurin im Überstand nachweisbar war, umso weniger pro-rvWF war vorhanden (vgl. Figur 2 I B mit 2 I A).

25 b. In vitro-Spaltung von pro-rvWF durch rFurin

Zum direkten Nachweis der rFurin-Prozessierungsaktivität für rekombinanten pro-vWF in vitro wurden serumfreie rFurin und pro-vWF-enthaltende Zellkulturüberstände gemischt und inkubiert, sowie entsprechende Kontrollen gemacht. Da vernünftige Expressionsausbeute von rwt-Furin in ausschließlich rFurin exprimierenden CHO-Zellen durch die Interferenz erhöhter rFurin-Konzentration mit der Lebensfähigkeit der Zellen nicht möglich ist, wurde auf rFurin/vWF-Zellen als Quelle für rFurin zurückgegriffen. Durch die Koexpression konnten detektierbare rFurin-Mengen erzielt werden. Entsprechend wurden CHO-rvWF, CHO-rvWF/rFurin, CHO-rvWF und CHO (im Verhältnis 1:1), sowie CHO-rvWF und CHO-rvWF/rFurin (im Verhältnis 1:1) gemischt und bei 37°C inkubiert.

Aliquote der Reaktionsansätze wurden direkt vor der Inkubation bzw. nach dem Mischen der Zellkulturüberstände mittels Western Blot-Analyse auf prozessierten vWF getestet; weitere Aliquote wurden in Zeitintervallen von jeweils 24 Stunden entnommen und untersucht.

Figur 3 zeigt eine vollständige Prozessierung von pro-rvWF nur in jenen Testansätzen, die entweder rvWF/rFurin koexprimiert hatten oder die CHO-rvWF/rFurin und CHO-rvWF enthielten (Figur 3 A, Spur 0-4, Figur 3 D, Spur 2 und 40 3 A, Spur 0), war in CHO-rvWF-Zellkulturüberständen noch zu 50% unprozessierter vWF im Zellkulturüberstand vorhanden (Figur 3 B und C). In Testansätzen, bei denen die Zellkulturüberstände von CHO-rvWF/rFurin und CHO-rvWF 45 gemischt worden waren, war nach 24 Stunden nur noch ein geringer Anteil an unprozessiertem pro-vWF nachweisbar (Figur 3 D, Spur 1). Eine Verlängerung der Inkubationsdauer auf 48 h und 96 h (Figur 3 D, Spur 2+4) führte zu vollständig prozessiertem vWF. Damit wurde der Nachweis erbracht, daß in den Überstand von CHO-rvWF/rFurin-Zellen sekretiertes rFurin biologisch aktiv ist und pro-rvWF aus CHO-rvWF-Überständen in vitro vollständig prozessiert.

Beispiel 3:

Klonierung und Expression von rFurin-Deletionsmutanten und rFurin-His-Tag-Fusionsproteinen

Zur Herstellung eines sekretionsfähigen rFurins wurden verschiedene C-terminal-trunkierte Furin-Deletionsmutanten konstruiert und diese zur späteren leichteren Isolierung aus dem Kulturmedium mit zusätzlichen heterologen Sequenzen fusioniert.

Alle rFurin-Mutanten wurden in den Expressionsvektor phAct-ΔEcoRIupstream, der den humanen β-Actin-Promotor enthält, kloniert und, wie in Beispiel 2 beschrieben, stabil in CHO-Zellen exprimiert.

Die Klonierung von Plasmid phAct-ΔEcoRIupstream erfolgte durch partialen EcoRI-Verdau von Plasmid phAct (Fischer et al., FEBS. Lett. 1994, 351:345-348), Auffüllen der überstehenden Enden mit Klenow-Enzym, und Religation. Plasmid phAct-ΔEcoRIupstream unterscheidet sich von phAct durch das Fehlen der EcoRI-Schnittstelle 5'-seitig des

Promotors; die EcoRI-Schnittstelle 3' des Promotors, bzw. des Introns, in der MCS ist dagegen noch vorhanden. Zur Deletion der C-terminalen transmembranen Domäne wurde die rFurin-cDNA nach Position 2127 der Nukleinsäuresequenz (Figur 4) und damit bei Aminosäure 709 deletiert. Mit Hilfe der synthetischen Oligonukleotide #2325 (5'-GATAAGCTTG TCGACCATGG AGCTGAGGCC CTG-3') (SEQ.ID.NO. 3) und #2819 (5'-AAGTCATGAA TTCTTAC AGCAGCCCTG CGCGCAG-3') (SEQ.ID.NO. 4) wurde anhand des "Templates" pSV-rFurink (Beispiel 1) mit der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ein DNA-Fragment generiert; dieses Fragment enthielt die Basenpaare analog der Δ TM-Fragment wurde an den flankierenden Sall- und EcoRI-Restriktionsstellen geschnitten und in den Sall/EcoRI geschnittenen Expressionsvektor phAct- Δ EcoRIupstream inseriert. Das entstandene Plasmid wird mit prFurin- Δ TM bezeichnet. Die Nukleotid- und Aminosäuresequenz von rFurin- Δ TM ist als SEQ.ID.NO. 5 und SEQ.ID.NO 6 wieder-gegeben.

Zur Herstellung von Furin Δ TM-Fusionsprotein mit einem 3'-seitig fusionierten Affinitätspeptid wurden an das C-terminale Ende von rFurin Δ TM an Aminosäure 707 (Basenpaar 2121) sechs Histidin-Reste (His-Tag) angehängt:

Mit Hilfe der synthetischen Oligonukleotide #2325 (SEQ.ID.NO. 3) und #2823 (5'-CTAGAATTCAAT GATGATGATG ATGATGCCCT GCGCGCAGCC GTTCCCC-3') (SEQ.ID.NO. 7) wurde anhand des "Templates" pSV-rFurink (Beispiel 1) mittels PCR ein DNA-Fragment enthaltend die Basenpaare analog der ersten 707 Aminosäuren des Furins, gefolgt von sechs Histidin-Resten und einem Translations-Terminations-Triplett hergestellt. Nach Schneiden der flankierenden Sall/ EcoRI-Restriktionsschnittstellen wurde dieses Fragment in die Sall/EcoRI-Schnittstellen des oben be-schriebenen Vektors phAct- Δ EcoRIupstream inseriert und so Plasmid prFurin Δ TM-His erhalten. Die Nukleotid- und Aminosäuresequenz von rFurin Δ TM-His ist als SEQ.ID.NO. 8 und SEQ.ID.NO. 9 wiedergegeben.

Zwischen die kodierende Region des deletierten rFurin Δ TM 707 und die His-Tag-Sequenz wurde ein Spacer, be-stehend aus Ala-Ala-Gly-Gly-Ala-Ala, inseriert, um eine sterische Behinderung der katalytischen Domäne des Furins zu verhindern und grössere Beweglichkeit und Funktionalität des Fusionsproteins bei Kopplung an eine Säulenmatrix zu gewährleisten. Die Inserierung der Spacer-Sequenz in prFurin Δ TM-His erfolgte mittels PCR mit den Oligonukleo-tiden # 2325 (SEQ.ID.NO. 3) und #2820 (5'-CTAGAATTCAAT GATGATGATG ATGATGTGCAGCTCC ACCAGCTGCC CCTGCGCGCA GCCGTTGCC C-3') (SEQ.ID.NO. 10). Analog zur Konstruktion von prFurin Δ TM-His wurde dieses Fragment in die Sall/EcoRI-Stelle von Plasmid phAct- Δ EcoRIupstream inseriert. Das entstandene Fusionsprotein wur-ID.NO. 11 und SEQ.ID.NO. 12 wiedergegeben.

Da das katalytische Zentrum von Furin am N-terminalen Ende des Moleküls lokalisiert ist, kann ein noch grösserer Bereich des C-Terminus, die Cys-reiche Region, ohne signifikante Einbussen der katalytischen Funktion deletiert wer-den.

Es wurde ein Konstrukt hergestellt, bei dem zusätzlich zur transmembranen Domäne auch die Cys-reiche Domäne deletiert ist. Dazu wurde in die Furin kodierende Sequenz nach Nukleotid-(Aminosäure 585) ein Terminations-Triplett inseriert. Zur Konstruktion von prFurin Δ Cys wurde mittels PCR ein DNA-Fragment mit Oligonukleotid #2325 (SEQ.ID. NO. 3) als 5'-Primer und Oligonukleotid #2821 (5'-CTA GAATTCTAA CTGCTTCTG GAGGTACGGG CAG-3') (SEQ. ID.NO. 15) als 3'-Primer generiert und analog zur Konstruktion von Furin Δ TM in phAct- Δ EcoRIupstream inseriert. Die Nukleotid- und Aminosäuresequenz von rFurin- Δ Cys ist als SEQ.ID.NO. 13 und SEQ.ID.NO. 14 wiedergegeben.

Analog zu den Furin Δ TM Fusionsprotein-Konstrukten wurden rFurin Δ Cys-Fusionsproteine mit einer His-Tag-Se-quenz nach Aminosäure 585 hergestellt. Dazu wurde ein PCR DNA-Fragment mit Oligonukleotid # 2325 (SEQ.ID.NO. 3) als 5'-Primer und Oligonukleotid # 2810 (5'-CTA GAATTCTTAG TGGTGATGGT GATGATGACT GCTTTCTGGAGG coRIupstream inseriert. Das entstandene Plasmid wurde prFurin Δ Cys-His genannt. Die Nukleotid- und Aminosäure-Sequenz von rFurin- Δ Cys-His ist als SEQ.ID.NO. 17 und SEQ.ID.NO. 18 wiedergegeben.

Die Konstruktion von rFurin Δ Cys-Spacer-His erfolgte mittels PCR mit Oligonukleotid # 2325 (SEQ.ID.NO. 3) als 5' Primer und Oligonukleotid # 2822 (5'-CTA GAATTCTTAG TGGTGATGGT GATGATGTC AGCTCCACCA GCTG- via Sall/ EcoRI-Schnittstelle in Plasmid pAct- Δ EcoRIupstream inseriert und prFurin Δ Cys-Spacer-His genannt. Die Nu-geben.

Es wurde im Rahmen der Untersuchungen gefunden, daß ein Teil der Furin-Moleküle endogen einige, wenige Aminosäuren vor Aminosäure 707 gespalten wird, was zu einem löslichen sogenannten "shed"-Furin führt.

Um ausschließlich Histidin-getagte rFurin-Molekül-Spezies im Überstand stabiler CHO-Zellen zu erhalten, die Aus-beute an trägeaffinem rFurin zu erhöhen, und schließlich bessere und stärkere Interaktion des "His-Tags" mit der Ni²⁺-NTA-Matrix und verbesserte sterische Bewegungsfreiheit des rFurin-Derivates an der Matrix zu ermöglichen, wurde ein verkürztes rFurin-Derivat konstruiert, das C-terminal der Mitteldomäne, d.h. nach Aminosäure 576 deletiert und mit einem Spacer und einem 10xHis-Rest fusioniert wurde. Dazu wurde prFurin Δ TM-His partiell mit Saul (an Nukleotid Position 1723-1739 in SEQ.ID.NO. 8) und vollständig mit EcoRI geschnitten und die Spacer-10xHis-Sequenz inseriert,

die mittels der annealten synthetischen Oligonukleotide 5'-TGAGGGAGGT GGGGGAGGTC ATCACCCACCA TCAC-CATCAT CATCACCAATT-3' (SEQ.ID.NO. 22) und 5'-ATTAATGGTGA TGATGATGGT GATGGTGGTG ATGACCTCCC CCACCTCCC-3' (SEQ.ID.NO. 23) regeneriert wurde. Das resultierende Plasmid wurde prFurin Δ Cys-Spacer-10xHis genannt.

5 Transiente Expression von rFurin Δ Cys-Spacer-10xHis in 293 HEK-Zellen (ATCC CRL 1573) zeigt, daß nur eine einzige mit anti-Furin monoklonalen Antikörper reaktive Protein-Bande, und diese in der erwarteten Molekülgröße von etwa 60kD (unter Berücksichtigung der Glycosylierung) zu finden ist. Mit an Ni $^{2+}$ -NTA gekoppelter alkalischer Phosphatase wurde zudem die Bindungsfähigkeit der Histidin-getagten Moleküle nachgewiesen (Fig. 5).

10 Um den C-terminalen Furin-Anteil weiter zu verkürzen, wurde prFurin Δ Cys-Spacer-10xHis zunächst partiell mit Saul und anschließend vollständig mit Maml geschnitten. In die Schnittstelle wurde ein DNA-Fragment regeneriert aus den annealten Oligonukleotiden #3787 (5'-GGACCCCTCT GGCGAGTGGG TCCTCGAGAT TGAAACACCC AGC-GAAGCCA ACAACTATGG GACGCT-3') (SEQ. ID. NO. 24) und #3788 (5'-TCAAGCGTCC CATAGTTGTT GGCTT-CGCTG GTGTTTCAA TCTCGAGGAC CCACTCGCCA GAGGGGTCC-3') (SEQ. ID. NO. 25) inseriert. Das resultierende Plasmid wurde prFurin Δ Cys-Spacer-10xHis genannt. Es kodiert für ein C-terminal deletiertes Furin, das die 15 ersten 563 Aminosäuren von Furin enthält, gefolgt von einem Spacer, bestehend aus einem Glutaminsäure-Rest, fünf Glycin-Resten und zehn Histidin-Resten.

Der Überstand transient mit diesem Konstrukt transfizierter 293 HEK-Zellen wies im Gegensatz zu nicht-transfizierten Zellen im fluorogenen Substrat-Test Prozessierungsaktivität auf.

20 Beispiel 4:

Nachweis der enzymatischen Aktivität von rFurin Δ TM-His

Der Nachweis der Furin- oder Fusionsprotein-Aktivität erfolgte mittels niedermolekularem Peptidsubstrat Boc-Arg-25 Val-Arg-Arg-AMC. Durch Einwirkung von Furin wird vom Substrat AMC (7-Amino-4-Methylcoumarin) abgespalten. Lösliches AMC besitzt dabei gegenüber dem Peptid-AMC fluoreszierende Eigenschaften, die zur Aktivitätsbestimmung von Furin benutzt werden können. Der fluoreszenzspektroskopische Nachweis der Furin- oder Fusionsprotein-Aktivität erfolgte bei 30°C in gerührten Quarzküvetten in einem Testvolumen von 2 ml. 1,7 ml 100mM HEPES-Puffer (pH 7,4, 30 1 mM CaCl₂ und 1 mM 2-Mercaptoethanol) wurden mit 0,1 ml Substratlösung (Substrat Endkonzentration im Test: 0,1 mM) und 0,2 ml Probe vermischt. Die Fluoreszenz wurde bei einer Wellenlänge von 380 nm angeregt. Nach 2 Stunden Inkubation wurde die Fluoreszenz-Emission bei 438 nm gemessen (Tabelle 1).

Tabelle 1: Aktivitätsnachweis von CHO-rFurin Δ TM-His

35 Die Überstände verschiedener permanenter CHO-rFurin Δ TM-His-Zellklone und als Kontrolle von CHO-rvWF/rFurin- und CHO-Zellen wurden dem AMC-Peptid-Substrat-Test unterzogen. Die Intensität der Fluoreszenz-Emission bei 438 nm gibt die Aktivität wieder.

Tabelle 1

ZELLKLONE	INTENSITÄT
CHO-rFurin Δ TM-His	2524
CHO-rvWF/rFurin	444
CHO	166

50 Beispiel 5:

Immobilisierung von Fusionsprotein rFurin Δ TM-His an einen Träger

Permanente CHO-Zellen, transfiziert mit gemäß Beispiel 3 konstruiertem Expressionsvektor prFurin Δ TM-His, wurden in Rollerflaschen im Medium angezüchtet. Das Zellkulturmedium wurde abgezogen, die Zellen sorgfältig mit PBS gewaschen und in serumfreiem Selektionsmedium weiterinkubiert. Der Zellkulturüberstand wurde anschließend alle 24 Stunden abgezogen und durch neues Medium ersetzt. Die Überstände wurde gesammelt und vereinigt. Zur Adsorption von sekretiertem rFurin Δ TM-His an Ni $^{2+}$ -NTA Agarose wurde 1 l Zellkulturüberstand mit Imidazol bis zu einer

Endkonzentration von 2 mM versetzt, 1 ml Ni²⁺-NTA Agarose zugegeben und die Suspension unter vorsichtigem Schütteln bei 4°C inkubiert. Das träger- und matrixgebundene Fusionsprotein wurde durch einfaches Absitzen oder Zentrifugation vom Überstand getrennt. Die Säulenmatrix mit gebundenem rFurinΔTM-His wurde in 10 ml Puffer A (300mM NaCl, 10% Glycerin, 1mM β-Mercaptoethanol, 2mM Imidazol, 5 mM Hepes pH 7,0, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂) resuspendiert und anschließend für 10 min bei 600 g zentrifugiert. Das Pellet wurde im gleichen Puffervolumen resuspendiert und eine Chromatographie-Säule damit beladen. Die Säule wurde anschließend mit 5 ml Puffer A, enthaltend 2 mM Imidazol, gewaschen und mit 5 ml serumfreiem Selektionsmedium equilibriert.

Die Elution von rFurinΔTM-His erfolgte mit Puffer A enthaltend 200 mM Imidazol. Die enzymatische Aktivität von rFurinΔTM-His erfolgte analog zu Beispiel 4. Das Ergebnis ist in Tabelle 2 zusammengefaßt. Es zeigte sich, daß rFurinΔTM-His an die Säulenmatrix bindet und als aktives Molekül wieder von der Säule eluierbar ist.

Tabelle 2: Die Aktivität von rFurinΔTM-His vor Bindung an die Ni²⁺-NTA-Matrix sowie nach Elution von der Matrix

15

Tabelle 2

ÜBERSTÄNDE	INTENSITÄT
Rollerüberstand	
CHO-rFurinΔTM-His	2664
Equilibrierung	-
1. Waschen	340
2. Waschen	280
3. Waschen	121
Eluat	2820

Die Aktivität von CHO-rFurinΔTM-His-Zellen aus Zellkulturüberständen vor der Bindung an die Säulenmatrix, der einzelnen Waschfraktionen sowie des Eluats wurden mittels AMC-Peptid-Substrat-Test bestimmt.

Beispiel 6

Aktivierung von pro-vWF an immobilisiertem Fusionsprotein

Die gemäß Beispiel 5 hergestellte rFurinΔTM-His-Ni²⁺-Säule wurde zur Prozessierung von rpro-vWF zu rvWF eingesetzt. Dazu wurden über die Säule 20 ml auf 2 mM Imidazol eingestellter, serumfreier Zellkulturüberstand von CHO-rvWF-Zellen geleitet. Aliquote des Eluats wurden über Western Blot (gemäß Beispiel 2) analysiert. Proben des Zellkulturüberstandes, die keiner Proteasebehandlung unterzogen wurden, dienten als Kontrolle. Proben von Zellkul-eluats nur vollständig prozessierten vWF nachgewiesen wurde.

Beispiel 7:

Reinigung von His-getagten rFurin-Fusionsproteinen an Ni²⁺-NTA-Matrix

Stabile CHO-Zellklöne, die rFurinΔcys-Spacer-10xHis sezernieren, wurden gemäß Beispiel 2 hergestellt und eine mit frischem, serum-freiem Kulturmedium äquilibrierte Ni²⁺-NTA-Matrix mit konditioniertem Medium solcher Klone beladen. Adsorbierte Proteine wurden mit Elutionspuffer, enthaltend steigende Konzentrationen an Imidazol, von der Säule eluiert und Aliquote der einzelnen Fraktionen im SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden anschließend mit

5 Silber gefärbt bzw. mittels Western-Blot-Analyse detektiert (Fig. 6). Die Silberfärbung zeigte, daß eine Vielzahl von Proteinen, enthalten im konditionierten Medium an die Matrix binden können, jedoch bereits bei niedriger Imidazol-Konzentration wieder eluiert werden. Bei einer Imidazol-Konzentration bis etwa 100mM wurden Kontaminanten von der Säule eluiert, wogegen Fraktionen, die bei höherer Imidazol-Konzentration eluiert wurden, nur noch ein Protein enthielten. Dieses Protein wurde im Western-Blot mit anti-Furin-Antikörpern als rFurinΔCys-Spacer-10xHis identifiziert.

10 Der Einfluß von Imidazol auf die Furin-Aktivität wurde bestimmt. Dazu wurde ein rFurinΔCys-Spacer-10xHis-haltiger CHO-Überstand mit steigenden Mengen von Imidazol versetzt und die Proben anschließend einem fluorogenen Substrat-Test (gemäß Beispiel 4) unterzogen. Tabelle 3 zeigt, daß mit steigender Imidazol-Konzentration die Fähigkeit identischer rFurin-Derivat-Mengen zur Umsetzung des fluorogenen Substrats sukzessive reduziert wird und die An-15 wesenheit von Imidazol die Furin-Aktivität somit inhibiert.

TABELLE 3:

Inhibition der Furin-Aktivität in Anwesenheit von Imidazol		Furin-Aktivität (Gemessene Fluoreszenz Units)
rFurin haltiger Überstand oder Medium	Imidazol Konzentration in Probe (mM)	
CHO-rFurin	0	>1000
	50	818
	100	587
	200	469
	500	24
CHO (ohne rFurin)	0	43
Medium (ohne CHO)	0	32

30 Imidazol-haltige rFurin-Derivat-Fraktionen wurden daher gegen 20mM Hepes pH 7,0, 1mM CaCl₂, 1mM β-Mercaptoethanol über Nacht bei 4°C dialysiert. Bei einem Vergleich der Proben vor und nach Dialyse zeigt sich, daß die Aktivität von rFurinΔCys-Spacer-10xHis nach Entfernen des Imidazols durch Dialyse von 408 auf >1000 Units (Fraktion mit 333 mM Imidazol eluiert) bzw. von 24 auf >1000 Units (Fraktion mit 780 mM Imidazol eluiert) wiederhergestellt werden konnte.

35 Die schnelle und sehr saubere Reinigung der Histidin-getagten rFurin-Derivate mittels der beschriebenen Methode ermöglicht somit eine großtechnische Prozeßentwicklung, z.B. gereinigte Pro-rvWF Moleküle (oder andere Target-Proteine) durch Epitop-getagte rFurin-Derivate in Lösung zu prozessieren. Nach vollständiger Prozessierung können die beiden Reaktionspartner mittels Ni²⁺-NTA-Matrix selektiv voneinander getrennt werden, wobei das vollständig prozessierte Substrat im Durchfluß entfernt und das rFurin-Derivat an die Matrix gebunden wird. Nach Elution von der Säulenmatrix und Dialyse steht das rFurin-Derivat für eine neue Prozessierungsreaktion zur Verfügung. Auf diese Weise ist es möglich, mittels wiederholter solcher rFurin-Derivat "Recycling"-Schritte mit verhältnismäßig wenig rFurin-Derivat in vitro, eine vergleichsweise große Menge von Pro-rvWF zu prozessieren.

Beispiel 8:

Nachweis der enzymatischen Aktivität von immobilisiertem rFurinΔCys-Spacer-10xHis

Der Nachweis der funktionellen Aktivität von immobilisiertem rFurinΔCys-Spacer-10xHis erfolgte durch Prozessierung des Furinspezifischen, fluorogenen Boc-Arg-Val-Arg-Arg-AMC-Substrats (gemäß Beispiel 4).

50 Dazu wurde 1 ml in Serum-freiem Zellkulturmedium äquilibrierte Ni²⁺-NTA-Matrix (Quiagen) bei 4°C mit 10ml Imidazol-freiem CHO-rFurinΔCys-Spacer-10xHis-Zellkulturüberstand, bzw. als Negativ-Kontrolle mit konditioniertem Medium nicht-manipulierter CHO-Zellen, beladen. Dann wurde die Matrix bei Raumtemperatur dreimal mit Serum-freiem Zellkulturmedium gewaschen und bei 30°C anschließend das fluorogene Substrat mit immobilisiertem rFurinΔCys-Spacer-10xHis in Kontakt gebracht. Als Positiv-Kontrolle wurde CHO-rFurinΔCys-Spacer-10xHis-Zellkulturüberstand auf seine Fähigkeit getestet, fluorogenes Substrat in Lösung umzusetzen.

55 Äquivalente Mengen (200µl) des Ausgangs-Zellkulturüberstandes, der Durchfluß-Fraktionen und der Waschschritte wurden, wie in Beispiel 4 beschrieben, auf ihren rFurin-Derivat-Inhalt mittels fluorogenem Substrat-Test untersucht.

Die ermittelten Substrat-Spaltungskapazitäts-Werte wurden mit den Wert in jener Substrathaltigen Lösungen verglichen, die mit der rFurin-Derivat gekoppelten Säulenmatrix exponiert waren.

Es zeigte sich, daß bei entsprechender Exposition Ni²⁺NTA-Matrix gebundenes rFurinΔCys-Spacer-10xHis mehr als 1000 Einheiten fluorogenen Substrats umsetzte und damit vergleichbar der Umsetzung des fluorogenen Substrats durch nicht-immobilisiertes rFurin-Derivat war. Mit konditioniertem Medium unmanipulierter CHO-Zellen "beladene" Säulenmatrix führte zu keiner Spaltung des fluorogenen Substrates.

Dies zeigte, daß rFurinΔCys-Spacer-10xHis nicht nur in Lösung, sondern auch im immobilisierten Zustand proteolytische Aktivität vermittelt. Abhängig vom Substrat (z.B. von Proproteinen rFIX, rFX, rvWF, rPC, rPS, etc.) ist es unter Umständen sinnvoll, die sterische Bindung des rFurin-Derivats an die Matrix durch entsprechende Variation des Matrix oder größere Beweglichkeit zu erwirken, um z.B. starres Abstehen von der ein gegebenes Substrat zu optimieren. Alternativ können Säulenmatrices verwendet werden, bei denen das gebundene rFurin-Derivat über einen längeren Säulenarm mit der Matrix verbunden ist, wie beispielsweise bei Tentakelgelen (siehe Beispiel 10).

Beispiel 9:

In vitro-Prozessierung von gereinigtem rvWF-Vorläufer durch gereinigtes rFurinΔCys-Spacer-10xHis

pro-rvWF-Vorläuferprotein wurde bis zur Homogenität gereinigt (mit einem rvWF-Antigen:Gesamt-Protein-Verhältnis von 2) und 10µg pro-rvWF mit 1340 U gereinigtem rFurinΔCys-Spacer-10xHis (siehe Beispiel 7) in Puffer (0,87mM CaCl₂, 17mM Hepes pH 7,0, 0,87mM Mercaptoethanol) bei 37°C inkubiert. Die Negativ-Kontrolle, ein unmanipulierter CHO-Zellkulturüberstand (ohne rFurinΔCys-Spacer-10xHis) wurde auf der Ni²⁺ NTA-Matrix in analoger Weise aufbereitet.

Aliquote der Reaktionsgemische wurden zu Testbeginn als auch zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen und weggefroren. Nach Beendigung der Inkubation wurden diese Aliquote unter reduzierten und denaturierten Bedingungen im SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot rvWF-reaktives Material (gemäß Beispiel 1) visualisiert. Figur 7 zeigt die Prozessierung von gereinigtem pro-rvWF durch gereinigtes rFurinΔCys-Spacer-10xHis unter definierten Bedingungen. Während in Anwesenheit des rFurin-Derivats pro-rvWF bereits nach vier Stunden vollständig deprozessiert war (Figur 7, oben), wurde bei Abwesenheit des rFurin-Derivats keine Prozessierung beobachtet (Figur 7, unten). Bei längerer Inkubation mit dem rFurin-Derivat wurden prozessierte rvWF-Moleküle nicht weiter proteolytisch abgebaut und die molekulare Integrität der reifen rvWF-Moleküle blieb über den gesamten Zeitraum der rFurin-Exposition stabil (Figur 7, oben).

Beispiel 10:

Prozessierung von Pro-Proteinen mittels an Chelat-Tentakelgelimmobilisiertem rFurinΔCys-Spacer-10xHis

Um die Interaktion von zu spaltendem Substrat mit Säulen-gebundenem rFurin-Derivat gegebenenfalls zu verbessern, wurde untersucht, ob als Säulen-Matrix statt Ni²⁺-NTA-Agarose in einem experimentellen Ansatz Fractogel EMD®-Tentakelgel (Fa. Merck) verwendet werden kann. Da die Metallionen hierbei im Vergleich zur Ni²⁺-NTA-Agarose räumlich weiter von der eigentlichen Säulen-Matrix entfernt sind, könnte eine verbesserte sterische Zugänglichkeit des gebundenen rFurin-Derivats ermöglicht werden. In dem vorliegenden Ansatz wurde Pro-Protein (pro-rvWF) durch Tentakelgel gebundenes rFurinΔCys-Spacer-10xHis prozessiert.

Das Fractogel EMD®-Tentakelgel wurde nach Herstellervorschrift mit Ni²⁺-Ionen beladen und mit frischem Serumfreien Zellkulturmedium äquilibriert. Anschließend wurde die Säule mit Serum-freiem CHO-rFurinΔCys-Spacer-10xHis-Überstand beladen. Waschschritte erfolgten durch Serum-freies Zellkulturmedium, enthaltend steigende Imidazol-Konzentrationen bis 40mM. Anschließend wurde das Pro-Protein-Substrat als Serum-freier CHO-Überstand über die Säule geleitet. Mittels Western-Blot-Analyse mit spezifischem vWF-Antiserum wurde die Prozessierung von Pro-Protein zu Protein im Durchfluß der Säule nachgewiesen.

B Beispiel 11:**Prozessierung von einzelkettigem rFX zu rFX leichte/schwere Kette durch rFurin Δ TM-His und rFurin Δ Cys-Spacerc-His****a. Herstellung des rFX-Expressionsvektors**

Zur Herstellung von rekombinantem FX (rFX) wurde die cDNA von FX aus einer humanen Leber Lambda-cDNA-Bank, wie von Messier et al. beschrieben (1991, Gene 99:291-294), isoliert. Aus einem positiven Klon wurde mittels PCR mit Oligonukleotid #2911 (5'-ATTACTCGAGAAGCTTACCATGGGGCGCCACTG-3') (SEQ.ID. NO. 26) als 5'-Primer und Oligonukleotid #2912 (5'-ATTACAATTGCTGCAGGGATCCAC-3') (SEQ.ID.NO.27) als 3'-Primer ein DNA-Fragment amplifiziert, das die 1,467kB FX-kodierende Sequenz sowie 39bp der 3'-nicht-translatierten Region, flankiert von einer Xhol-Schnittstelle, am 5'-Ende und einer MfeI-Schnittstelle am 3'-Ende enthält. Zusätzlich wurde durch den Primer #2911 die Sequenz ACC vor das ATG des FX eingebaut, so daß eine optimale Kozak-Transkriptions-Sequenz entsteht. Anschließend wurde dieses PCR-Produkt als Xhol/MfeI-Fragment in den mit Sall und EcoRI geschnittenen Expressionsvektor phAct-rFX bezeichnet (Figur 8).

Der Expressionsvektor phAct umfaßt den humanen beta-Actin-Promotor, 78bp 5'UTR sowie das Intron, eine multiple Klonierungsschnittstelle und die SV40-Polyadenylierungstelle.

b. Expression von rFX in CHO-Zellen

Zur Etablierung einer stabilen rFX-exprimierenden Zelllinie wurden, wie in Beispiel 2 beschrieben, dhfr-defiziente CHO-Zellen mit dem Expressionsplasmid phAct-rFX und dem Selektionsmarker-plasmid pSV-dhfr co-transfiziert. Für alle weiteren Expressions- und Funktionsanalysen wurden die Zellkulturen mit serumfreiem Selektionsmedium in Anwesenheit von 10 µg/ml Vitamin K 24 Stunden lang inkubiert. Die Expression von rFX in den resultierenden Zellklonen wurde anhand der Antigenmenge (ELISA) nachgewiesen und das rekombinante Protein anschließend mit SDS-PAGE (wie in Beispiel 2 beschrieben) charakterisiert (Figur 9 A und B). In den Initialklonen und Subklonen liegt, wie im Western-Blot erkennbar (Figur 9 A), das rekombinante FX-Protein in der Form einer leichten Kette (LC) von 22kD und einer schweren Kette (HC) von 45kD vor, die identisch mit dem plasmatischen Faktor X-Protein sind. Zusätzlich ist eine Proteinbande bei 75kD zu erkennen, die dem einzelkettigen (SC) Molekül entspricht und deren Präsenz in FX-transfizierten CHO-Zellen (Wolf et al. J. Biol. Chem. 266:13726-13730, 1991) sowie in humanem Plasma (Fair et al. Blood 64:194-204, 1984) beschrieben wurde. Zur Herstellung von hochexprimierenden Klonen wurden die Initialklone mit steigenden Mengen Methotrexat amplifiziert und anschließend bis zur Stabilisierung subkloniert. Die Expression konnte von ca. 200-500 ng/10E6-Zellen bzw. 1µg/ml auf 30-50µg/10E6-Zellen bzw. 100µg/ml pro 24 Stunden gesteigert werden. Die Western-Blot-Analyse dieser hochexprimierenden Zellklonüberstände (Figur 9 B und Figur 9 A Spur 2) zeigt eine Anreicherung des einzelkettigen rFX-Moleküls sowie die Anwesenheit zusätzlicher Formen der leichten Kette. Neben der 22kD-Form der leichten Kette, die der plasmatischen Form entspricht (vollständig carboxyliert ohne Propeptid) liegen zumindest zwei weitere Varianten der leichten Kette mit ca. 21kD und 20kD vor. Die Heterogenität der leichten Kette in diesen Klonen konnte mittels einer N-terminalen Sequenzierung des rekombinanten Materials auf eine unvollständige Abspaltung des Propeptids (ca. 50% des rFX-Materials) sowie auf Untercarboxylierung (ca. 50% des rFX) zurückgeführt werden. Das 21kD-Protein ist eine untercarboxylierte propeptid-haltige und das 20kD-Protein eine untercarboxylierte pro-peptid-freie Form der leichten Kette.

c. In vitro-Abspaltung des Propeptides und Prozessierung des einzelkettigen rFX in rFX leichte/schwere Kette durch rFurin Δ TM-His oder rFurin Δ Cys-Spacer-His.

Aufgrund der Sequenzhomologie der Spaltstellen zwischen Faktor X Propeptid/N-Terminus der leichten Kette (RVTR/A) und zwischen leichter/schwerer Kette (RRKR/S) mit der Konsensus-Furin-Erkennungssequenz (RX^{K/R}R/X) bestand die Möglichkeit, die Prozessierung sowohl einzelkettiger als auch Propeptid-haltiger rFX-Moleküle durch rFurin in vitro zu verbessern. Zellkulturüberstände von CHO-rFX und CHO-rFurin Δ TM-His (beschrieben in Beispiel 3) sowie CHO-rFX und CHO (als Negativkontrolle) wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und bei 37°C inkubiert. Aliquote der Reaktionsansätze wurden vor Inkubation (t=0) und nach verschiedenen Inkubationszeiten (t=2, 4, 6 Stunden) mittels Western-Blot-Analyse auf prozessierten rFX getestet (Figur 10). Der Nachweis von rFX in den Zellkulturüberständen erfolgte mittels eines anti-humanen FX-Antiserums (Figur 10 A) und eines monokonalen Antikörpers spezifisch für die leichte Kette des FX (Figur 10 B).

Im Gegensatz zu dem CHO-rFX/CHO-Gemisch weist das CHO-rFX/CHO-rFurin Δ TM-His schon nach zwei Stunden Inkubation bei 37°C (Figur 10 A, Spur 7; Figur 10 B, Spur 8) eine fast vollständige Prozessierung vor. Einzelkettiger rFX ist zum Großteil in die leichte und schwere Kettenform umgesetzt. Im Bereich der leichten Kette wurden nur noch

die prozessierten Pro-Peptid-freien Formen von 22kD (carboxylierte Form) und 20kD (untercarboxylierte Form) in einem Verhältnis von ca. 50:50 gefunden. Die korrekte Abspaltung der Pro-Sequenz zwischen Arg-1 und Ala+1 und die Homogenität des N-Terminus der leichten Kette wurde mittels N-terminaler Sequenzierung festgestellt. Im Kontrollexperiment, in dem CHO-rFX mit CHO-Überständen gemischt wurde, ist auch nach einer 6-stündigen Inkubation keine Veränderung des rFX-Bandenmusters zu erkennen. Damit wurde nachgewiesen, daß rFurin Δ TM-His im Überstand von CHO-Zellen biologisch aktiv ist und sowohl die Prozessierung des Pro-Peptids als auch der schweren/leichten Kette von rFX durchführen kann. Die Prozessierung von rFX wurde auch mit CHO-rFurin Δ Cys-Spacer-His-Konstrukten nachgewiesen.

10 d. Aktivität des in vitro prozessierten CHO-rFX

Die Überstände aus dem unter c.) angeführten Experiment wurden anschließend mittels FX-Coatest-Kit (Fa. Chrogenix) auf FX-Aktivität getestet. Dazu wurden 50 μ l von jedem Überstand mit 50 μ l FX-defizientem, humanen Plasma versetzt und laut Protokoll des Herstellers rFX mit Schlangengift (RVV) in Anwesenheit von CaCl₂ zu rFXa umgesetzt; rFXa hydrolysiert anschließend das chromogene Substrat (S-2337) und führt zur Freisetzung des gelbfarbigen Para-nitroanilin. Da die Menge an rFXa und die Farbintensität proportional zueinander sind, kann anhand einer Eichgerade, interpoliert aus Werten einer Plasma-Verdünnungsreihe, die Menge zu rFXa aktivierbarem rFX/ml Zellkulturüberstand bestimmt werden. Mit diesen Ergebnissen und der bekannten rFX-Antigenmenge (ELISA-Daten) kann der Anteil von dem in Faktor Xa aktiviertem rFaktor X in % ausgerechnet werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt.

20

25

30

35

40

45

50

55

TABELLE 4

Probe	OD bei 405nm	Aktivität mU/ml	ELISA µg/ml	% Funktioneller FX
Plasma 100%	0,829	991,1		
Plasma 50%	0,434	515,7		
Plasma 25%	0,217	254,5		
Plasma 12,5%	0,108	123,3		
Plasma 6,25%	0,054	58,3		
Puffer	0,001	0,0		
CHO/CHO-rFurin	0,008	3,0	0,0	
t=0	0,001	0,0	0,0	
t=2	0,010	5,4	0,0	
t=4	0,006	0,6	0,0	
CHO-rFX/CHO	0,170	197,9	19,9	24,9
t=0	0,131	151,0	19,9	19,0
t=2	0,153	177,5	19,9	22,3
t=4	0,163	189,5	19,9	23,8
CHO-rFX/CHO-rFurin	0,151	175,1	19,9	22,0
t=0	0,235	276,2	19,9	34,7
t=2	0,260	306,3	19,9	38,5
t=4	0,292	344,8	19,9	43,3

Um unspezifische, proteolytische Aktivität in CHO- und CHO-rFurin Δ TM-His-Überständen auszuschließen, wurde das Gemisch dieser beiden Zellkulturüberstände ebenso untersucht. Die geringen OD-Werte (weniger als 7% der

EP 0 775 750 A2

proteolytischen Aktivität), die in diesen Überständen gefunden wurden, sind photometrische Schwankungen und liegen innerhalb der Standardabweichung. Signifikante unspezifische proteolytische Aktivität in CHO-Überständen, die den Test beeinflussen könnte, wurde somit ausgeschlossen.

CHO-rFX inkubiert mit CHO-Überständen (ohne rFurin) als Kontrolle zeigte auch nach 6 Stunden keinen wesentlichen Anstieg der rFXa-Aktivität, die aufgrund der experimentellen Schwankungen zwischen 150-200mU/ml lag und 19-25% funktionellem rFX entsprach. Wurde im Vergleich dazu CHO-rFX mit CHO-rFurin Δ TM-His inkubiert, so entstand schon nach zwei Stunden eine signifikante Steigerung der rFX-Aktivität, die nach 6 Stunden 344mU/ml bzw. 43% funktionellen Anteil des CHO-rFX erreichte. Diese Daten korrelieren sehr gut mit der Anwesenheit von 50% der aktiven bzw. carboxylierten leichten Kette mit 22kD und 50% der inaktiven bzw. untercarboxylierten leichten Kette mit 20kD in diesen behandelten Überständen (Figur 10).

Damit wurde nachgewiesen, daß durch in vitro-Prozessierung von CHO-rFX aus hochexprimierenden Klonen mittels rFurin-Derivat der Anteil von zu funktionellem rFXa aktivierbaren rFX wesentlich verbessert wird.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

SEQUENZPROTOKOLL

5 (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

(A) NAME: IMMUNO AG
(B) STRASSE: Industriestrasse 67
(C) ORT: Wien
(D) BUNDESLAND: Austria
(E) LAND: Austria
(F) POSTLEITZAHL: 1220

15

20

25

30

35

40

45

50 (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Herstellung von Proteinen aus Proteinen durch Fusionsproteine abgeleitet von Furin oder Furinanalogen

55 (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 27

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 75 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GGCCATCGAT TGAATTCCCC GGGTCCTCT AGAGTCGACC TGCAGAAGCT TAGTACTAGT

60

AGGCCTAGGG CCCTA

75

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 75 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

GGCCTAGGGC CCTAGGCCTA CTAGTACTAA GCTTCTGCAG GTCGACTCTA GAGGACCCCG

60

GGGAATTCAA TCGAT

75

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 33 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GATAAGCTTG TCGACCATGG AGCTGAGGCC CTG

33

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 34 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

5 AAGTCATGAA TTCTTACAGC AGCCCTGCGC GCAG

34

10 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

15 (i) SEQUENZKENNZICHEN:

- (A) LÄNGE: 2130 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

15 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

20 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

20	ATGGAGCTGA GGCCCTGGTT GCTATGGGTG GTAGCAGCAA CAGGAACCTT GGTCCCTGCTA	60
	GCAGCTGATG CTCAGGGCCA GAAGGTCTTC ACCAACACGT GGGCTGTGCG CATCCCTGGA	120
	GGCCCAGCGG TGGCCAACAG TGTGGCACGG AAGCATGGGT TCCTCAACCT GGGCCAGATC	180
25	TTCGGGGACT ATTACCACTT CTGGCATCGA GGAGTGACGA AGCGGTCCCT GTGCCTCAC	240
	CGCCCCGCGC ACAGCCGGCT GCAGAGGGAG CCTCAAGTAC AGTGGCTGGA ACAGCAGGTG	300
	GCAAAGCGAC GGACTAAACG GGACGTGTAC CAGGAGCCCA CAGACCCCAA GTTTCCTCAG	360
30	CAGTGGTACC TGTCTGGTGT CACTCAGCGG GACCTGAATG TGAAGGCGGC CTGGCGCAG	420
	GGCTACACAG GGCACGGCAT TGTGGTCTCC ATTCTGGACG ATGGCATCGA GAAGAACAC	480
35	CCGGACTTGG CAGGCAATTA TGATCCTGGG GCCAGTTTG ATGTCAATGA CCAGGACCC	540
	GACCCCCAGC CTCGGTACAC ACAGATGAAT GACAACAGGC ACGGCACACG GTGTGGGGGG	600
	GAAGTGGCTG CGGTGGCAA CAACGGTGTG TGTGGTGTAG GTGTGGCTA CAACGCCCGC	660
40	ATTGGAGGGG TGCGCATGCT GGATGGCGAG GTGACAGATG CAGTGGAGGC ACGCTCGCTG	720
	GGCCTGAACC CCAACCACAT CCACATCTAC AGTGCCAGCT GGGGCCCCGA GGATGACGGC	780
	AAGACAGTGG ATGGGCCAGC CGGCCTCGCC GAGGAGGCCT TCTTCCGTGG GTTAGCCAG	840
45	GGCCGAGGGG GGCTGGCTC CATCTTTGTC TGGGCCTCGG GGAACGGGGG CCGGGAACAT	900
	GACAGCTGCA ACTGCGACGG CTACACCAAC AGTATCTACA CGCTGTCCAT CAGCAGGCC	960
	ACGCAGTTG GCAACGTGCC GTGGTACAGC GAGGCCTGCT CGTCCACACT GGCCACGACC	1020
50	TACAGCAGTG GCAACCAGAA TGAGAAGCAG ATCGTGACGA CTGACTTGCG GCAGAAGTGC	1080
	ACGGAGTCTC ACACGGGCAC CTCAGCCTCT GCCCCCTTAG CAGCCGGCAT CATTGCTCTC	1140
55	ACCCCTGGAGG CCAATAAGAA CCTCACATGG CGGGACATGC AACACCTGGT GGTACAGACC	1200

5	TCGAAGCCAG CCCACCTCAA TGCCAACGAC TGGGCCACCA ATGGTGTGGG CCGGAAAGTG	1260
	AGCCACTCAT ATGGCTACGG GCTTTGGAC GCAGGCGCCA TGGTGGCCCT GGCCCAGAAT	1320
	TGGACCACAG TGGCCCCCA GCGGAAGTGC ATCATCGACA TCCTCACCGA GCCCAAAGAC	1380
10	ATCGGGAAAC GGCTCGAGGT GCGGAAGACC GTGACCGCGT GCCTGGCGA GCCCAACCAC	1440
	ATCACTCGGC TGGAGCACGC TCAGGCGCGG CTCACCCGT CCTATAATCG CCGTGGCGAC	1500
	CTGGCCATCC ACCTGGTCAG CCCATGGGC ACCCGCTCCA CCCTGCTGGC AGCCAGGCCA	1560
15	CATGACTACT CCGCAGATGG GTTTAATGAC TGGGCCTTCA TGACAACCTCA TTCCTGGGAT	1620
	GAGGATCCCT CTGGCGAGTG GGTCTAGAG ATTGAAAACA CCAGCGAAGC CAACAACAT	1680
	GGGACGCTGA CCAAGTTCAC CCTCGTACTC TATGGCACCG CCCCTGAGGG GCTGCCCGTA	1740
20	CCTCCAGAAA GCAGTGGCTG CAAGACCCCTC ACGTCCAGTC AGGCCTGTGT GGTGTGCGAG	1800
	GAAGGCTTCT CCCTGCACCA GAAGAGCTGT GTCCAGCACT GCCCTCCAGG CTTCGCCCCC	1860
	CAAGTCCTCG ATACGCACTA TAGCACCGAG AATGACGTGG AGACCATCCG GGCCAGCGTC	1920
25	TGCGCCCCCT GCCACGCCTC ATGTGCCACA TGCCAGGGC CGGCCCTGAC AGACTGCCTC	1980
	AGCTGCCCCA GCCACGCCTC CTTGGACCCCT GTGGAGCAGA CTTGCTCCCG GCAAAGCCAG	2040
30	AGCAGCCGAG AGTCCCCGCC ACAGCAGCAG CCACCTCGGC TGCCCCCGGA GGTGGAGGCG	2100
	GGGCAACGGC TGCGCGCAGG GCTGCTGTAA	2130

35 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 709 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

45 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

Met	Glu	Leu	Arg	Pro	Trp	Leu	Leu	Trp	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Gly	Thr
1					5				10					15	

50	Leu	Val	Leu	Leu	Ala	Ala	Asp	Ala	Gln	Gly	Gln	Lys	Val	Phe	Thr	Asn
					20			25				30				

55	Thr	Trp	Ala	Val	Arg	Ile	Pro	Gly	Gly	Pro	Ala	Val	Ala	Asn	Ser	Val
					35			40				45				

60	Ala	Arg	Lys	His	Gly	Phe	Leu	Asn	Leu	Gly	Gln	Ile	Phe	Gly	Asp	Tyr
					50			55			60					

Tyr His Phe Trp His Arg Gly Val Thr Lys Arg Ser Leu Ser Pro His
 65 70 75 80
 Arg Pro Arg His Ser Arg Leu Gln Arg Glu Pro Gln Val Gln Trp Leu
 85 90 95
 Glu Gln Gln Val Ala Lys Arg Arg Thr Lys Arg Asp Val Tyr Gln Glu
 100 105 110
 Pro Thr Asp Pro Lys Phe Pro Gln Gln Trp Tyr Leu Ser Gly Val Thr
 115 120 125
 Gln Arg Asp Leu Asn Val Lys Ala Ala Trp Ala Gln Gly Tyr Thr Gly
 130 135 140
 His Gly Ile Val Val Ser Ile Leu Asp Asp Gly Ile Glu Lys Asn His
 145 150 155 160
 Pro Asp Leu Ala Gly Asn Tyr Asp Pro Gly Ala Ser Phe Asp Val Asn
 165 170 175
 Asp Gln Asp Pro Asp Pro Gln Pro Arg Tyr Thr Gln Met Asn Asp Asn
 180 185 190
 Arg His Gly Thr Arg Cys Ala Gly Glu Val Ala Ala Val Ala Asn Asn
 195 200 205
 Gly Val Cys Gly Val Gly Val Ala Tyr Asn Ala Arg Ile Gly Val
 210 215 220
 Arg Met Leu Asp Gly Glu Val Thr Asp Ala Val Glu Ala Arg Ser Leu
 225 230 235 240
 Gly Leu Asn Pro Asn His Ile His Ile Tyr Ser Ala Ser Trp Gly Pro
 245 250 255
 Glu Asp Asp Gly Lys Thr Val Asp Gly Pro Ala Arg Leu Ala Glu Glu
 260 265 270
 Ala Phe Phe Arg Gly Val Ser Gln Gly Arg Gly Leu Gly Ser Ile
 275 280 285
 Phe Val Trp Ala Ser Gly Asn Gly Arg Glu His Asp Ser Cys Asn
 290 295 300
 Cys Asp Gly Tyr Thr Asn Ser Ile Tyr Thr Leu Ser Ile Ser Ser Ala
 305 310 315 320
 Thr Gln Phe Gly Asn Val Pro Trp Tyr Ser Glu Ala Cys Ser Ser Thr
 325 330 335
 Leu Ala Thr Thr Tyr Ser Ser Gly Asn Gln Asn Glu Lys Gln Ile Val
 340 345 350
 Thr Thr Asp Leu Arg Gln Lys Cys Thr Glu Ser His Thr Gly Thr Ser
 355 360 365
 Ala Ser Ala Pro Leu Ala Ala Gly Ile Ile Ala Leu Thr Leu Glu Ala
 370 375 380
 55

EP 0 775 750 A2

Asn Lys Asn Leu Thr Trp Arg Asp Met Gln His Leu Val Val Gln Thr
 385 390 395 400
 5 Ser Lys Pro Ala His Leu Asn Ala Asn Asp Trp Ala Thr Asn Gly Val
 405 410 415
 Gly Arg Lys Val Ser His Ser Tyr Gly Tyr Gly Leu Leu Asp Ala Gly
 420 425 430
 10 Ala Met Val Ala Leu Ala Gln Asn Trp Thr Thr Val Ala Pro Gln Arg
 435 440 445
 Lys Cys Ile Ile Asp Ile Leu Thr Glu Pro Lys Asp Ile Gly Lys Arg
 450 455 460
 15 Leu Glu Val Arg Lys Thr Val Thr Ala Cys Leu Gly Glu Pro Asn His
 465 470 475 480
 20 Ile Thr Arg Leu Glu His Ala Gln Ala Arg Leu Thr Leu Ser Tyr Asn
 485 490 495
 Arg Arg Gly Asp Leu Ala Ile His Leu Val Ser Pro Met Gly Thr Arg
 500 505 510
 25 Ser Thr Leu Leu Ala Ala Arg Pro His Asp Tyr Ser Ala Asp Gly Phe
 515 520 525
 Asn Asp Trp Ala Phe Met Thr Thr His Ser Trp Asp Glu Asp Pro Ser
 530 535 540
 30 Gly Glu Trp Val Leu Glu Ile Glu Asn Thr Ser Glu Ala Asn Asn Tyr
 545 550 555 560
 Gly Thr Leu Thr Lys Phe Thr Leu Val Leu Tyr Gly Thr Ala Pro Glu
 565 570 575
 35 Gly Leu Pro Val Pro Pro Glu Ser Ser Gly Cys Lys Thr Leu Thr Ser
 580 585 590
 Ser Gln Ala Cys Val Val Cys Glu Glu Gly Phe Ser Leu His Gln Lys
 595 600 605
 40 Ser Cys Val Gln His Cys Pro Pro Gly Phe Ala Pro Gln Val Leu Asp
 610 615 620
 Thr His Tyr Ser Thr Glu Asn Asp Val Glu Thr Ile Arg Ala Ser Val
 625 630 635 640
 Cys Ala Pro Cys His Ala Ser Cys Ala Thr Cys Gln Gly Pro Ala Leu
 645 650 655
 45 Thr Asp Cys Leu Ser Cys Pro Ser His Ala Ser Leu Asp Pro Val Glu
 660 665 670
 Gln Thr Cys Ser Arg Gln Ser Gln Ser Ser Arg Glu Ser Pro Pro Gln
 675 680 685
 50 Gln Gln Pro Pro Arg Leu Pro Pro Glu Val Glu Ala Gly Gln Arg Leu
 690 695 700

Arg Ala Gly Leu Leu
705

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 50 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

CTAGAATTCA ATGATGATGA TGATGATGCC CTGCGGCCAG CCGTTGCC 50

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 2142 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

ATGGAGCTGA GGCCCTGGTT GCTATGGGTG GTAGCAGCAA CAGGAACCTT GGTCTTGCTA	60
GCAGCTGATG CTCAGGGCCA GAAGGTCTTC ACCAACACGT GGGCTGTGCG CATCCCTGGA	120
GGCCCAGCGG TGGCCAACAG TGTGGCACGG AAGCATGGGT TCCTCAACCT GGGCCAGATC	180
TTCGGGGACT ATTACCACTT CTGGCATCGA GGAGTGACGA AGCGGTCCCT GTCGCCTCAC	240
CGCCCGCCGC ACAGCCGGCT GCAGAGGGAG CCTCAAGTAC AGTGGCTGGA ACAGCAGGTG	300
GCAAAGCGAC GGACTAAACG GGACGTGTAC CAGGAGCCA CAGACCCCAA GTTCCTCAG	360
CAGTGGTACC TGTCTGGTGT CACTCAGCGG GACCTGAATG TGAAGGCGGC CTGGGCGCAG	420
GGCTACACAG GGCACGGCAT TGTGGTCTCC ATTCTGGACG ATGGCATCGA GAAGAACAC	480
CGGGACTTGG CAGGCAATTA TGATCCTGGG GCCAGTTTG ATGTCAATGA CCAGGACCC	540
GACCCCCAGC CTCGGTACAC ACAGATGAAT GACAACAGGC ACGGCACACG GTGTGCGGG	600
GAAGTGGCTG CGGTGGCCAA CAACGGTGTG TGTGGTGTAG GTGTGGCTA CAACGCCGC	660
ATTGGAGGGG TGCGCATGCT GGATGGCGAG GTGACAGATG CAGTGGAGGC ACGCTCGCTG	720
GGCCTGAACC CCAACCACAT CCACATCTAC AGTGCCAGCT GGGGCCCGA GGATGACGGC	780
AAGACAGTGG ATGGGCCAGC CCGCCTCGCC GAGGAGGCCT TCTTCCGTGG GGTTAGCCAG	840

5	GGCCGAGGGG GGCTGGGCTC CATCTTGTC TGGGCCTCGG GGAACGGGGG CCGGGAACAT	900
	GACAGCTGCA ACTGCGACGG CTACACCAAC AGTATCTACA CGCTGTCCAT CAGCAGCGCC	960
	ACGCAGTTG GCAACGTGCC GTGGTACAGC GAGGCCTGCT CGTCCACACT GGCCACGACC	1020
10	TACAGCAGTG GCAACCAGAA TGAGAAGCAG ATCGTGACGA CTGACTTGCG GCAGAAGTGC	1080
	ACGGAGTCTC ACACGGGCAC CTCAGCCTCT GCCCCCTTAG CAGCCGGCAT CATTGCTCTC	1140
	ACCCCTGGAGG CCAATAAGAA CCTCACATGG CGGGACATGC AACACCTGGT GGTACAGACC	1200
15	TCGAAGCCAG CCCACCTCAA TGCCAACGAC TGGGCCACCA ATGGTGTGGG CCGGAAAGTG	1260
	AGCCACTCAT ATGGCTACGG GCTTTGGAC GCAGGCGCCA TGGTGGCCCT GGCCCAGAAT	1320
	TGGACCACAG TGGCCCCCA GCGGAAGTGC ATCATCGACA TCCTCACCGA GCCCAAAGAC	1380
20	ATCGGGAAAC GGCTCGAGGT GCGGAAGACC GTGACCGCGT GCCTGGCGA GCCCAACCAC	1440
	ATCACTCGGC TGGAGCACGC TCAGGCGGG CTCACCCCTGT CCTATAATCG CCGTGGCGAC	1500
25	CTGGCCATCC ACCTGGTCAG CCCATGGGC ACCCGCTCCA CCCTGCTGGC AGCCAGGCCA	1560
	CATGACTACT CCGCAGATGG GTTTAATGAC TGGGCCTTC TGACAACTCA TTCCTGGGAT	1620
	GAGGATCCCT CTGGCGAGTG GGTCTAGAG ATTGAAAACA CCAGCGAAGC CAACAACTAT	1680
30	GGGACGCTGA CCAAGTTCAC CCTCGTACTC TATGGCACCG CCCCTGAGGG GCTGCCCGTA	1740
	CCTCCAGAAA GCAGTGGCTG CAAGACCTC ACGTCCAGTC AGGCCTGTGT GGTGTGGAG	1800
35	GAAGGCTTCT CCCTGCACCA GAAGAGCTGT GTCCAGCACT GCCCTCCAGG CTTCGCCCCC	1860
	CAAGTCCTCG ATACGCACTA TAGCACCGAG AATGACGTGG AGACCATCCG GGCCAGCGTC	1920
	TGCGCCCCCT GCCACGCCTC ATGTGCCACA TGCCAGGGGC CGGCCCTGAC AGACTGCCTC	1980
40	AGCTGCCCA GCCACGCCTC CTTGGACCCCT GTGGAGCAGA CTTGCTCCCG GCAAAGCCAG	2040
	AGCAGCCGAG AGTCCCCGCC ACAGCAGCAG CCACCTCGGC TGCCCCCGGA GGTGGAGGCG	2100
45	GGGCAACGGC TGCGCGCAGG GCATCATCAT CATCATCATT GA	2142

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

50 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 713 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

55 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

Met Glu Leu Arg Pro Trp Leu Leu Trp Val Val Ala Ala Thr Gly Thr
 1 5 10 15

Leu Val Leu Leu Ala Ala Asp Ala Gln Gly Gln Lys Val Phe Thr Asn
 20 25 30

Thr Trp Ala Val Arg Ile Pro Gly Gly Pro Ala Val Ala Asn Ser Val
 35 40 45

Ala Arg Lys His Gly Phe Leu Asn Leu Gly Gln Ile Phe Gly Asp Tyr
 50 55 60

Tyr His Phe Trp His Arg Gly Val Thr Lys Arg Ser Leu Ser Pro His
 65 70 75 80

Arg Pro Arg His Ser Arg Leu Gln Arg Glu Pro Gln Val Gln Trp Leu
 85 90 95

Glu Gln Gln Val Ala Lys Arg Arg Thr Lys Arg Asp Val Tyr Gln Glu
 100 105 110

Pro Thr Asp Pro Lys Phe Pro Gln Gln Trp Tyr Leu Ser Gly Val Thr
 115 120 125

Gln Arg Asp Leu Asn Val Lys Ala Ala Trp Ala Gln Gly Tyr Thr Gly
 130 135 140

His Gly Ile Val Val Ser Ile Leu Asp Asp Gly Ile Glu Lys Asn His
 145 150 155 160

Pro Asp Leu Ala Gly Asn Tyr Asp Pro Gly Ala Ser Phe Asp Val Asn
 165 170 175

Asp Gln Asp Pro Asp Pro Gln Pro Arg Tyr Thr Gln Met Asn Asp Asn
 180 185 190

Arg His Gly Thr Arg Cys Ala Gly Glu Val Ala Ala Val Ala Asn Asn
 195 200 205

Gly Val Cys Gly Val Gly Val Ala Tyr Asn Ala Arg Ile Gly Gly Val
 210 215 220

Arg Met Leu Asp Gly Glu Val Thr Asp Ala Val Glu Ala Arg Ser Leu
 225 230 235 240

Gly Leu Asn Pro Asn His Ile His Ile Tyr Ser Ala Ser Trp Gly Pro
 245 250 255

Glu Asp Asp Gly Lys Thr Val Asp Gly Pro Ala Arg Leu Ala Glu Glu
 260 265 270

Ala Phe Phe Arg Gly Val Ser Gln Gly Arg Gly Gly Leu Gly Ser Ile
 275 280 285

Phe Val Trp Ala Ser Gly Asn Gly Gly Arg Glu His Asp Ser Cys Asn
 290 295 300

EP 0 775 750 A2

Cys Asp Gly Tyr Thr Asn Ser Ile Tyr Thr Leu Ser Ile Ser Ser Ala
 305 310 315 320
 5 Thr Gln Phe Gly Asn Val Pro Trp Tyr Ser Glu Ala Cys Ser Ser Thr
 325 330 335
 Leu Ala Thr Thr Tyr Ser Ser Gly Asn Gln Asn Glu Lys Gln Ile Val
 340 345 350
 10 Thr Thr Asp Leu Arg Gln Lys Cys Thr Glu Ser His Thr Gly Thr Ser
 355 360 365
 Ala Ser Ala Pro Leu Ala Ala Gly Ile Ile Ala Leu Thr Leu Glu Ala
 370 375 380
 15 Asn Lys Asn Leu Thr Trp Arg Asp Met Gln His Leu Val Val Gln Thr
 385 390 395 400
 Ser Lys Pro Ala His Leu Asn Ala Asn Asp Trp Ala Thr Asn Gly Val
 20 405 410 415
 Gly Arg Lys Val Ser His Ser Tyr Gly Tyr Gly Leu Leu Asp Ala Gly
 420 425 430
 25 Ala Met Val Ala Leu Ala Gln Asn Trp Thr Thr Val Ala Pro Gln Arg
 435 440 445
 Lys Cys Ile Ile Asp Ile Leu Thr Glu Pro Lys Asp Ile Gly Lys Arg
 450 455 460
 30 Leu Glu Val Arg Lys Thr Val Thr Ala Cys Leu Gly Glu Pro Asn His
 465 470 475 480
 Ile Thr Arg Leu Glu His Ala Gln Ala Arg Leu Thr Leu Ser Tyr Asn
 485 490 495
 35 Arg Arg Gly Asp Leu Ala Ile His Leu Val Ser Pro Met Gly Thr Arg
 500 505 510
 Ser Thr Leu Leu Ala Ala Arg Pro His Asp Tyr Ser Ala Asp Gly Phe
 40 515 520 525
 Asn Asp Trp Ala Phe Met Thr Thr His Ser Trp Asp Glu Asp Pro Ser
 530 535 540
 45 Gly Glu Trp Val Leu Glu Ile Glu Asn Thr Ser Glu Ala Asn Asn Tyr
 545 550 555 560
 Gly Thr Leu Thr Lys Phe Thr Leu Val Leu Tyr Gly Thr Ala Pro Glu
 565 570 575
 50 Gly Leu Pro Val Pro Pro Glu Ser Ser Gly Cys Lys Thr Leu Thr Ser
 580 585 590
 Ser Gln Ala Cys Val Val Cys Glu Glu Gly Phe Ser Leu His Gln Lys
 595 600 605
 55 Ser Cys Val Gln His Cys Pro Pro Gly Phe Ala Pro Gln Val Leu Asp
 610 615 620

EP 0 775 750 A2

Thr His Tyr Ser Thr Glu Asn Asp Val Glu Thr Ile Arg Ala Ser Val
 625 630 635 640
 Cys Ala Pro Cys His Ala Ser Cys Ala Thr Cys Gln Gly Pro Ala Leu
 645 650 655
 Thr Asp Cys Leu Ser Cys Pro Ser His Ala Ser Leu Asp Pro Val Glu
 660 665 670
 Gln Thr Cys Ser Arg Gln Ser Gln Ser Ser Arg Glu Ser Pro Pro Gln
 675 680 685
 Gln Gln Pro Pro Arg Leu Pro Pro Glu Val Glu Ala Gly Gln Arg Leu
 690 695 700
 Arg Ala Gly His His His His His
 705 710

20 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 68 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

CTAGAATTCA ATGATGATGA TGATGATGTG CAGCTCCACC AGCTGCCCT GCGCGCAGCC
GTTGCCCT

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 2160 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

ATGGAGCTGA GGCCCTGGTT GCTATGGGTG GTAGCAGCAA CAGGAACCTT GGTCCCTGCTA	60
GCAGCTGATG CTCAGGGCCA GAAGGTCTTC ACCAACACGT GGGCTGTGCG CATCCCTGGA	120
GGCCCAGCGG TGGCCAACAG TGTGGCACGG AAGCATGGGT TCCTCAACCT GGGCCAGATC	180
TTCGGGGACT ATTACCACTT CTGGCATCGA GGAGTGACGA AGCGGTCCCT GTCGCCTCAC	240
CGCCCCGGGC ACAGCCGGCT GCAGAGGGAG CCTCAAGTAC AGTGGCTGGA ACAGCAGGTG	300

EP 0 775 750 A2

5	GCAAAGCGAC GGACTAAACG GGACGTGTAC CAGGAGCCCA CAGACCCCAA GTTTCCTCAG	360
	CAGTGGTACC TGTCTGGTGT CACTCAGCGG GACCTGAATG TGAAAGCGGC CTGGGCGGAG	420
	GGCTACACAG GGCACGGCAT TGTGGTCTCC ATTCTGGACG ATGGCATCGA GAAGAACACAC	480
	CCGGACTTGG CAGGCAATTA TGATCCTGGG GCCAGTTTG ATGTCATGA CCAGGACCT	540
10	GACCCCCAGC CTGGTACAC ACAGATGAAT GACAACAGGC ACGGCACACG GTGTGCGGGG	600
	GAAGTGGCTG CGGTGGCCAA CAACGGTGTG TGTGGTGTAG GTGTGGCCTA CAACGCCCGC	660
	ATTGGAGGGG TGCGCATGCT GGATGGCGAG GTGACAGATG CAGTGGAGGC ACGCTCGCTG	720
15	GGCCTGAACC CCAACCACAT CCACATCTAC AGTGCCAGCT GGGGCCCGA GGATGACGGC	780
	AAGACAGTGG ATGGGCCAGC CCGCCTCGCC GAGGAGGCCT TCTTCCTGTT GGTTAGCCAG	840
	GGCCGAGGGG GGCTGGGCTC CATCTTGTC TGGGCCTCGG GGAACGGGGG CCGGGAACAT	900
20	GACAGCTGCA ACTGCGACGG CTACACCAAC AGTATCTACA CGCTGTCCAT CAGCAGCGCC	960
	ACGCAGTTTG GCAACGTGCC GTGGTACAGC GAGGCCTGCT CGTCCACACT GGCCACGACC	1020
	TACAGCAGTG GCAACCAGAA TGAGAAGCAG ATCGTGACGA CTGACTTGCG GCAGAAGTGC	1080
25	ACGGAGTCTC ACACGGGCAC CTCAGCCTCT GCCCCCTTAG CAGCCGGCAT CATTGCTCTC	1140
	ACCTGGAGG CCAATAAGAA CCTCACATGG CGGGACATGC AACACCTGGT GGTACAGACC	1200
	TCGAAGCCAG CCCACCTCAA TGCCAACGAC TGGGCCACCA ATGGTGTGGG CCGGAAAGTG	1260
30	AGCCACTCAT ATGGCTACGG GCTTTGGAC GCAGGCGCCA TGGTGGCCCT GGCCCAGAAT	1320
	TGGACCACAG TGGCCCCCAGA GCGGAAGTGC ATCATCGACA TCCTCACCGA GCCAAAGAC	1380
35	ATCGGGAAAC GGCTCGAGGT GCGGAAGACC GTGACCGCGT GCCTGGCGA GCCCAACCAC	1440
	ATCACTCGGC TGGAGCACGC TCAGGCGCGG CTCACCCCTGT CCTATAATCG CGTGGCGAC	1500
40	CTGGCCATCC ACCTGGTCAG CCCATGGGC ACCCGCTCCA CCCTGCTGGC AGCCAGGCCA	1560
	CATGACTACT CCGCAGATGG GTTTAATGAC TGGCCTTCA TGACAACTCA TTCTGGGAT	1620
	GAGGATCCCT CTGGCGAGTG GGTCCCTAGAG ATTGAAAACA CCAGCGAAGC CAACAATAT	1680
45	GGGACGCTGA CCAAGTTCAC CCTCGTACTC TATGGCACCG CCCCTGAGGG GCTGCCCGTA	1740
	CCTCCAGAAA GCAGTGGCTG CAAGACCCCTC ACGTCCAGTC AGGCCTGTGT GGTGTGCGAG	1800
	GAAGGCTTCT CCCTGCACCA GAAGAGCTGT GTCCAGCACT GCCCTCCAGG CTTGCCCGCC	1860
50	CAAGTCCTCG ATACGCACTA TAGCACCGAG AATGACGTGG AGACCATCCG GGCCAGCGTC	1920
	TGCGCCCCCT GCCACGCCTC ATGTGCCACA TGCCAGGGC CGGCCCTGAC AGACTGCCTC	1980
	AGCTGCCCGA GCCACGCCTC CTTGGACCCCT GTGGAGCAGA CTTGCTCCCG GCAAAGCCAG	2040
55	AGCAGCCGAG AGTCCCCGCC ACAGCAGCAG CCACCTCGGC TGCCCCCGGA GGTGGAGGCG	2100

GGGCAACGGC TGCGCGCAGG GGCAGCTGGT GGAGCTGCAC ATCATCATCA TCATCATTGA 2160

5 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 719 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

15 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

Met Glu Leu Arg Pro Trp Leu Leu Trp Val Val Ala Ala Thr Gly Thr
 1 5 10 15

20 Leu Val Leu Leu Ala Ala Asp Ala Gln Gly Gln Lys Val Phe Thr Asn
 20 25 30

Thr Trp Ala Val Arg Ile Pro Gly Gly Pro Ala Val Ala Asn Ser Val
 35 40 45

25 Ala Arg Lys His Gly Phe Leu Asn Leu Gly Gln Ile Phe Gly Asp Tyr
 50 55 60

30 Tyr His Phe Trp His Arg Gly Val Thr Lys Arg Ser Leu Ser Pro His
 65 70 75 80

Arg Pro Arg His Ser Arg Leu Gln Arg Glu Pro Gln Val Gln Trp Leu
 85 90 95

35 Glu Gln Gln Val Ala Lys Arg Arg Thr Lys Arg Asp Val Tyr Gln Glu
 100 105 110

40 Pro Thr Asp Pro Lys Phe Pro Gln Gln Trp Tyr Leu Ser Gly Val Thr
 115 120 125

Gln Arg Asp Leu Asn Val Lys Ala Ala Trp Ala Gln Gly Tyr Thr Gly
 130 135 140

45 His Gly Ile Val Val Ser Ile Leu Asp Asp Gly Ile Glu Lys Asn His
 145 150 155 160

Pro Asp Leu Ala Gly Asn Tyr Asp Pro Gly Ala Ser Phe Asp Val Asn
 165 170 175

50 Asp Gln Asp Pro Asp Pro Gln Pro Arg Tyr Thr Gln Met Asn Asp Asn
 180 185 190

Arg His Gly Thr Arg Cys Ala Gly Glu Val Ala Ala Val Ala Asn Asn
 195 200 205

55 Gly Val Cys Gly Val Gly Val Ala Tyr Asn Ala Arg Ile Gly Gly Val
 210 215 220

EP 0 775 750 A2

Arg Met Leu Asp Gly Glu Val Thr Asp Ala Val Glu Ala Arg Ser Leu
 225 230 235 240
 5 Gly Leu Asn Pro Asn His Ile His Ile Tyr Ser Ala Ser Trp Gly Pro
 245 250 255
 Glu Asp Asp Gly Lys Thr Val Asp Gly Pro Ala Arg Leu Ala Glu Glu
 260 265 270
 10 Ala Phe Phe Arg Gly Val Ser Gln Gly Arg Gly Leu Gly Ser Ile
 275 280 285
 Phe Val Trp Ala Ser Gly Asn Gly Arg Glu His Asp Ser Cys Asn
 15 290 295 300
 Cys Asp Gly Tyr Thr Asn Ser Ile Tyr Thr Leu Ser Ile Ser Ser Ala
 305 310 315 320
 20 Thr Gln Phe Gly Asn Val Pro Trp Tyr Ser Glu Ala Cys Ser Ser Thr
 325 330 335
 Leu Ala Thr Thr Tyr Ser Ser Gly Asn Gln Asn Glu Lys Gln Ile Val
 340 345 350
 25 Thr Thr Asp Leu Arg Gln Lys Cys Thr Glu Ser His Thr Gly Thr Ser
 355 360 365
 Ala Ser Ala Pro Leu Ala Ala Gly Ile Ile Ala Leu Thr Leu Glu Ala
 370 375 380
 30 Asn Lys Asn Leu Thr Trp Arg Asp Met Gln His Leu Val Val Gln Thr
 385 390 395 400
 Ser Lys Pro Ala His Leu Asn Ala Asn Asp Trp Ala Thr Asn Gly Val
 405 410 415
 35 Gly Arg Lys Val Ser His Ser Tyr Gly Tyr Gly Leu Leu Asp Ala Gly
 420 425 430
 Ala Met Val Ala Leu Ala Gln Asn Trp Thr Thr Val Ala Pro Gln Arg
 440 445
 40 435 445
 Lys Cys Ile Ile Asp Ile Leu Thr Glu Pro Lys Asp Ile Gly Lys Arg
 450 455 460
 Leu Glu Val Arg Lys Thr Val Thr Ala Cys Leu Gly Glu Pro Asn His
 465 470 475 480
 45 Ile Thr Arg Leu Glu His Ala Gln Ala Arg Leu Thr Leu Ser Tyr Asn
 485 490 495
 Arg Arg Gly Asp Leu Ala Ile His Leu Val Ser Pro Met Gly Thr Arg
 50 500 505 510
 Ser Thr Leu Leu Ala Ala Arg Pro His Asp Tyr Ser Ala Asp Gly Phe
 515 520 525
 55 Asn Asp Trp Ala Phe Met Thr Thr His Ser Trp Asp Glu Asp Pro Ser
 530 535 540

Gly Glu Trp Val Leu Glu Ile Glu Asn Thr Ser Glu Ala Asn Asn Tyr
 545 550 555 560
 Gly Thr Leu Thr Lys Phe Thr Leu Val Leu Tyr Gly Thr Ala Pro Glu
 565 570 575
 Gly Leu Pro Val Pro Pro Glu Ser Ser Gly Cys Lys Thr Leu Thr Ser
 580 585 590
 Ser Gln Ala Cys Val Val Cys Glu Glu Gly Phe Ser Leu His Gln Lys
 595 600 605
 Ser Cys Val Gln His Cys Pro Pro Gly Phe Ala Pro Gln Val Leu Asp
 610 615 620
 Thr His Tyr Ser Thr Glu Asn Asp Val Glu Thr Ile Arg Ala Ser Val
 625 630 635 640
 Cys Ala Pro Cys His Ala Ser Cys Ala Thr Cys Gln Gly Pro Ala Leu
 645 650 655
 Thr Asp Cys Leu Ser Cys Pro Ser His Ala Ser Leu Asp Pro Val Glu
 660 665 670
 Gln Thr Cys Ser Arg Gln Ser Gln Ser Arg Glu Ser Pro Pro Gln
 675 680 685
 Gln Gln Pro Pro Arg Leu Pro Pro Glu Val Glu Ala Gly Gln Arg Leu
 690 695 700
 Arg Ala Gly Ala Ala Gly Gly Ala Ala His His His His His His
 705 710 715
 30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

35 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1758 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

45 ATGGAGCTGA GGCCCTGGTT GCTATGGGTG GTAGCAGCAA CAGGAACCTT GGTCCCTGCTA 60
 GCAGCTGATG CTCAGGGCCA GAAGGTCTTC ACCAACACGT GGGCTGTGCG CATCCCTGGA 120
 50 GGCCCAGCGG TGGCCAACAG TGTGGCACGG AAGCATGGGT TCCTCAACCT GGGCCAGATC 180
 TTCGGGGACT ATTACCACTT CTGGCATCGA GGAGTGACGA AGCGGTCCCT GTCGCCTCAC 240
 CGCCCGCGGC ACAGCCGGCT GCAGAGGGAG CCTCAAGTAC AGTGGCTGGA ACAGCAGGTG 300
 55 GCAAAGCGAC GGACTAAACG GGACGTGTAC CAGGAGCCCA CAGACCCAA GTTTCCTCAG 360

	CAGTGGTACC TGTCTGGTGT CACTCAGCGG GACCTGAATG TGAAGGCGGC CTGGGCGCAG	420
5	GGCTACACAG GGCACGGCAT TGTGGTCTCC ATTCTGGACG ATGGCATCGA GAAGAACAC	480
	CGGGACTTGG CAGGCAATTG TGATCCTGGG GCCAGTTTG ATGTCAATGA CCAGGACCT	540
	GACCCCCAGC CTCGGTACAC ACAGATGAAT GACAACAGGC ACGGCACACG GTGTGCGGGG	600
10	GAAGTGGCTG CGGTGGCCAA CAACGGTGTG TGTGGTGTAG GTGTGGCTA CAACGCCGC	660
	ATTGGAGGGG TGCGCATGCT GGATGGCGAG GTGACAGATG CAGTGGAGGC ACGCTCGCTG	720
	GGCCTGAACC CCAACCACAT CCACATCTAC AGTGCCAGCT GGGGCCCGA GGATGACGGC	780
15	AAGACAGTGG ATGGGCCAGC CCGCCTCGCC GAGGAGGCCT TCTTCGTGG GGTTAGGCCAG	840
	GGCCGAGGGG GGCTGGGCTC CATCTTGTG TGGGCCTCGG GGAACGGGGG CGGGAAACAT	900
	GACAGCTGCA ACTGCGACGG CTACACCAAC AGTATCTACA CGCTGTCCAT CAGCAGCGCC	960
20	ACGCAGTTG GCAACGTGCC GTGGTACAGC GAGGCCCTGCT CGTCCACACT GGCCACGACC	1020
	TACAGCAGTG GCAACCAGAA TGAGAAGCAG ATCGTGACGA CTGACTTGCG GCAGAAGTGC	1080
	ACGGAGTCTC ACACGGGCAC CTCAGCCTCT GCCCCCTTAG CAGCCGGCAT CATTGCTCTC	1140
25	ACCCCTGGAGG CCAATAAGAA CCTCACATGG CGGGACATGC AACACCTGGT GGTACAGACC	1200
	TCGAAGCCAG CCCACCTCAA TGCCACGAC TGGGCCACCA ATGGTGTGGG CCGGAAAGTG	1260
	AGCCACTCAT ATGGCTACGG GCTTTGGAC GCAGGCGCCA TGGTGGCCCT GGCCCAGAAT	1320
30	TGGACCACAG TGGCCCCCAG GCGGAAGTGC ATCATCGACA TCCCTCACCGA GCCCAAAGAC	1380
	ATCGGGAAAC GGCTCGAGGT GCGGAAGACC GTGACCGCGT GCCTGGCGA GCCCAACCAC	1440
35	ATCACTCGGC TGGAGCACGC TCAGGCGCGG CTCACCCCTGT CCTATAATCG CCGTGGCGAC	1500
	CTGGCCATCC ACCTGGTCAG CCCCATGGC ACCCGCTCCA CCCTGCTGGC AGCCAGGCCA	1560
40	CATGACTACT CCGCAGATGG GTTAATGAC TGGCCTTCA TGACAACTCA TTCCTGGGAT	1620
	GAGGATCCCT CTGGCGAGTG GGTCTAGAG ATTGAAAACA CCAGCGAAGC CAACAACAT	1680
	GGGACGCTGA CCAAGTTCAC CCTCGTACTC TATGGCACCG CCCCTGAGGG GCTGCCCGTA	1740
45	CCTCCAGAAA GCAGTTAG	1758

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

50 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 585 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

55 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

Met Glu Leu Arg Pro Trp Leu Leu Trp Val Val Ala Ala Thr Gly Thr
 5 10 15
 1 5 10 15
 Leu Val Leu Leu Ala Ala Asp Ala Gln Gly Gln Lys Val Phe Thr Asn
 20 25 30
 Thr Trp Ala Val Arg Ile Pro Gly Gly Pro Ala Val Ala Asn Ser Val
 35 40 45
 Ala Arg Lys His Gly Phe Leu Asn Leu Gly Gln Ile Phe Gly Asp Tyr
 50 55 60
 Tyr His Phe Trp His Arg Gly Val Thr Lys Arg Ser Leu Ser Pro His
 65 70 75 80
 Arg Pro Arg His Ser Arg Leu Gln Arg Glu Pro Gln Val Gln Trp Leu
 85 90 95
 20 Glu Gln Gln Val Ala Lys Arg Arg Thr Lys Arg Asp Val Tyr Gln Glu
 100 105 110
 Pro Thr Asp Pro Lys Phe Pro Gln Gln Trp Tyr Leu Ser Gly Val Thr
 115 120 125
 25 Gln Arg Asp Leu Asn Val Lys Ala Ala Trp Ala Gln Gly Tyr Thr Gly
 130 135 140
 His Gly Ile Val Val Ser Ile Leu Asp Asp Gly Ile Glu Lys Asn His
 145 150 155 160
 30 Pro Asp Leu Ala Gly Asn Tyr Asp Pro Gly Ala Ser Phe Asp Val Asn
 165 170 175
 35 Asp Gln Asp Pro Asp Pro Gln Pro Arg Tyr Thr Gln Met Asn Asp Asn
 180 185 190
 Arg His Gly Thr Arg Cys Ala Gly Glu Val Ala Ala Val Ala Asn Asn
 195 200 205
 40 Gly Val Cys Gly Val Gly Val Ala Tyr Asn Ala Arg Ile Gly Gly Val
 210 215 220
 Arg Met Leu Asp Gly Glu Val Thr Asp Ala Val Glu Ala Arg Ser Leu
 225 230 235 240
 45 Gly Leu Asn Pro Asn His Ile His Ile Tyr Ser Ala Ser Trp Gly Pro
 245 250 255
 Glu Asp Asp Gly Lys Thr Val Asp Gly Pro Ala Arg Leu Ala Glu Glu
 50 260 265 270
 Ala Phe Phe Arg Gly Val Ser Gln Gly Arg Gly Gly Leu Gly Ser Ile
 275 280 285
 Phe Val Trp Ala Ser Gly Asn Gly Gly Arg Glu His Asp Ser Cys Asn
 55 290 295 300

EP 0 775 750 A2

Cys Asp Gly Tyr Thr Asn Ser Ile Tyr Thr Leu Ser Ile Ser Ser Ala
 305 310 315 320

5 Thr Gln Phe Gly Asn Val Pro Trp Tyr Ser Glu Ala Cys Ser Ser Thr
 325 330 335

10 Leu Ala Thr Thr Tyr Ser Ser Gly Asn Gln Asn Glu Lys Gln Ile Val
 340 345 350

15 Thr Thr Asp Leu Arg Gln Lys Cys Thr Glu Ser His Thr Gly Thr Ser
 355 360 365

20 Ala Ser Ala Pro Leu Ala Ala Gly Ile Ile Ala Leu Thr Leu Glu Ala
 370 375 380

25 Asn Lys Asn Leu Thr Trp Arg Asp Met Gln His Leu Val Val Gln Thr
 385 390 395 400

30 Ser Lys Pro Ala His Leu Asn Ala Asn Asp Trp Ala Thr Asn Gly Val
 405 410 415

35 Gly Arg Lys Val Ser His Ser Tyr Gly Tyr Gly Leu Leu Asp Ala Gly
 420 425 430

40 Ala Met Val Ala Leu Ala Gln Asn Trp Thr Thr Val Ala Pro Gln Arg
 435 440 445

45 Lys Cys Ile Ile Asp Ile Leu Thr Glu Pro Lys Asp Ile Gly Lys Arg
 450 455 460

50 Leu Glu Val Arg Lys Thr Val Thr Ala Cys Leu Gly Glu Pro Asn His
 465 470 475 480

55 Ile Thr Arg Leu Glu His Ala Gln Ala Arg Leu Thr Leu Ser Tyr Asn
 485 490 495

60 Arg Arg Gly Asp Leu Ala Ile His Leu Val Ser Pro Met Gly Thr Arg
 500 505 510

65 Ser Thr Leu Leu Ala Ala Arg Pro His Asp Tyr Ser Ala Asp Gly Phe
 515 520 525

70 Asn Asp Trp Ala Phe Met Thr Thr His Ser Trp Asp Glu Asp Pro Ser
 530 535 540

75 Gly Glu Trp Val Leu Glu Ile Glu Asn Thr Ser Glu Ala Asn Asn Tyr
 545 550 555 560

80 Gly Thr Leu Thr Lys Phe Thr Leu Val Leu Tyr Gly Thr Ala Pro Glu
 565 570 575

85 Gly Leu Pro Val Pro Pro Glu Ser Ser
 580 585

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

5 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 35 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

10 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

15 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

20 CTAGAATTCT AACTGCTTTC TGGAGGTACG GGCAG

35

15 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

20 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 54 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

25 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

30 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

35 CTAGAATTCT TAGTGGTGAT GGTGATGATG ACTGCTTCT GGAGGTACGG GCAG

54

30 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

35 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 1776 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

40 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

45 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

50 ATGGAGCTGA GGCCCTGGTT GCTATGGGTG GTAGCAGCAA CAGGAACCTT GGTCCCTGCTA

60

GCAGCTGATG CTCAGGGCCA GAAGGTCTTC ACCAACACGT GGGCTGTGCG CATCCCTGGA

120

GGCCCAGCGG TGGCCAACAG TGTGGCACGG AAGCATGGGT TCCTCAACCT GGGCCAGATC

180

TTCGGGGACT ATTACCACTT CTGGCATCGA GGAGTGACGA AGCGGTCCCT GTCGCCTCAC

240

CGCCCGCGGC ACAGCCGGCT GCAGAGGGAG CCTCAAGTAC AGTGGCTGGA ACAGCAGGTG

300

GCAAAGCGAC GGACTAAACG GGACGTGTAC CAGGAGCCCA CAGACCCAA GTTTCCTCAG

360

CAGTGGTACC TGTCTGGTGT CACTCAGCGG GACCTGAATG TGAAGGCGGC CTGGGCGCAG

420

GGCTACACAG GGCACGGCAT TGTGGTCTCC ATTCTGGACG ATGGCATCGA GAAGAACAC

480

5	CCGGACTTGG CAGGCAATTA TGATCCTGGG GCCAGTTTG ATGTCAATGA CCAGGACCCCT	540
	GACCCCCAGC CTCGGTACAC ACAGATGAAT GACAACAGGC ACGGCACACG GTGTGCGGGG	600
	GAAGTGGCTG CGGTGGCCAA CAACGGTGTC TGTGGTGTAG GTGTGGCCTA CAACGCCCGC	660
10	ATTGGAGGGG TGCGCATGCT GGATGGCGAG GTGACAGATG CAGTGGAGGC ACGCTCGCTG	720
	GGCCTGAACC CCAACCACAT CCACATCTAC AGTGCCAGCT GGGGCCCCGA GGATGACGGC	780
	AAGACAGTGG ATGGGCCAGC CCGCCTCGCC GAGGAGGCCT TCTTCCGTGG GGTTAGCCAG	840
15	GGCCGAGGGG GGCTGGGCTC CATCTTGTC TGGGCCTCGG GGAACGGGGG CCGGAAACAT	900
	GACAGCTGCA ACTGCGACGG CTACACCAAC AGTATCTACA CGCTGTCCAT CAGCAGCGCC	960
	ACGCAGTTG GCAACGTGCC GTGGTACAGC GAGGCCTGCT CGTCCACACT GGCCACGACC	1020
20	TACAGCAGTG GCAACCAGAA TGAGAAGCAG ATCGTGACGA CTGACTTGCG GCAGAAGTGC	1080
	ACGGAGTCTC ACACGGGCAC CTCAGCCTCT GCCCCCTTAG CAGCCGGCAT CATTGCTCTC	1140
	ACCCCTGGAGG CCAATAAGAA CCTCACATGG CGGGACATGC AACACCTGGT GGTACAGACC	1200
25	TCGAAGCCAG CCCACCTCAA TGCCAACGAC TGGGCCACCA ATGGTGTGGG CCGGAAAGTG	1260
	AGCCACTCAT ATGGCTACGG GCTTTGGAC GCAGGCGCCA TGGTGGCCCT GGCCCAGAAT	1320
30	TGGACCACAG TGGCCCCCA CGGGAAGTGC ATCATCGACA TCCTCACCGA GCCCAAAGAC	1380
	ATCGGGAAAC GGCTCGAGGT CGGGAAGACC GTGACCGCGT GCCTGGCGA GCCCAACCAC	1440
35	ATCACTCGGC TGGAGCACGC TCAGGCGCGG CTCACCTGT CCTATAATCG CCGTGGCGAC	1500
	CTGGCCATCC ACCTGGTCAG CCCCATGGC ACCCGCTCCA CCCTGCTGGC AGCCAGGCCA	1560
	CATGACTACT CCGCAGATGG GTTTAATGAC TGGGCCTTCA TGACAACTCA TTCCTGGGAT	1620
40	GAGGATCCCT CTGGCGAGTG GGTCTAGAG ATTGAAAACA CCAGCGAAGC CAACAACTAT	1680
	GGGACGCTGA CCAAGTCAC CCTCGTACTC TATGGCACCG CCCCTGAGGG GCTGCCCGTA	1740
45	CCTCCAGAAA GCAGTCATCA TCACCATCAC CACTAA	1776

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18:

50 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 591 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

55 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

Met Glu Leu Arg Pro Trp Leu Leu Trp Val Val Ala Ala Thr Gly Thr
 1 5 10 15

Leu Val Leu Leu Ala Ala Asp Ala Gln Gly Gln Lys Val Phe Thr Asn
 20 25 30

Thr Trp Ala Val Arg Ile Pro Gly Gly Pro Ala Val Ala Asn Ser Val
 35 40 45

Ala Arg Lys His Gly Phe Leu Asn Leu Gly Gln Ile Phe Gly Asp Tyr
 50 55 60

Tyr His Phe Trp His Arg Gly Val Thr Lys Arg Ser Leu Ser Pro His
 65 70 75 80

Arg Pro Arg His Ser Arg Leu Gln Arg Glu Pro Gln Val Gln Trp Leu
 85 90 95

Glu Gln Gln Val Ala Lys Arg Arg Thr Lys Arg Asp Val Tyr Gln Glu
 100 105 110

Pro Thr Asp Pro Lys Phe Pro Gln Gln Trp Tyr Leu Ser Gly Val Thr
 115 120 125

Gln Arg Asp Leu Asn Val Lys Ala Ala Trp Ala Gln Gly Tyr Thr Gly
 130 135 140

His Gly Ile Val Val Ser Ile Leu Asp Asp Gly Ile Glu Lys Asn His
 145 150 155 160

Pro Asp Leu Ala Gly Asn Tyr Asp Pro Gly Ala Ser Phe Asp Val Asn
 165 170 175

Asp Gln Asp Pro Asp Pro Gln Pro Arg Tyr Thr Gln Met Asn Asp Asn
 180 185 190

Arg His Gly Thr Arg Cys Ala Gly Glu Val Ala Ala Val Ala Asn Asn
 195 200 205

Gly Val Cys Gly Val Gly Val Ala Tyr Asn Ala Arg Ile Gly Gly Val
 210 215 220

Arg Met Leu Asp Gly Glu Val Thr Asp Ala Val Glu Ala Arg Ser Leu
 225 230 235 240

Gly Leu Asn Pro Asn His Ile His Ile Tyr Ser Ala Ser Trp Gly Pro
 245 250 255

Glu Asp Asp Gly Lys Thr Val Asp Gly Pro Ala Arg Leu Ala Glu Glu
 260 265 270

Ala Phe Phe Arg Gly Val Ser Gln Gly Arg Gly Gly Leu Gly Ser Ile
 275 280 285

Phe Val Trp Ala Ser Gly Asn Gly Gly Arg Glu His Asp Ser Cys Asn
 290 295 300

EP 0 775 750 A2

Cys Asp Gly Tyr Thr Asn Ser Ile Tyr Thr Leu Ser Ile Ser Ser Ala
 305 310 315 320
 5 Thr Gln Phe Gly Asn Val Pro Trp Tyr Ser Glu Ala Cys Ser Ser Thr
 325 330 335
 10 Leu Ala Thr Thr Tyr Ser Ser Gly Asn Gln Asn Glu Lys Gln Ile Val
 340 345 350
 15 Thr Thr Asp Leu Arg Gln Lys Cys Thr Glu Ser His Thr Gly Thr Ser
 355 360 365
 20 Ala Ser Ala Pro Leu Ala Ala Gly Ile Ile Ala Leu Thr Leu Glu Ala
 370 375 380
 25 Asn Lys Asn Leu Thr Trp Arg Asp Met Gln His Leu Val Val Gln Thr
 385 390 395 400
 30 Ser Lys Pro Ala His Leu Asn Ala Asn Asp Trp Ala Thr Asn Gly Val
 405 410 415
 35 Gly Arg Lys Val Ser His Ser Tyr Gly Tyr Gly Leu Leu Asp Ala Gly
 420 425 430
 40 Ala Met Val Ala Leu Ala Gln Asn Trp Thr Thr Val Ala Pro Gln Arg
 435 440 445
 45 Lys Cys Ile Ile Asp Ile Leu Thr Glu Pro Lys Asp Ile Gly Lys Arg
 450 455 460
 50 Leu Glu Val Arg Lys Thr Val Thr Ala Cys Leu Gly Glu Pro Asn His
 465 470 475 480
 55 Ile Thr Arg Leu Glu His Ala Gln Ala Arg Leu Thr Leu Ser Tyr Asn
 485 490 495
 60 Arg Arg Gly Asp Leu Ala Ile His Leu Val Ser Pro Met Gly Thr Arg
 500 505 510
 65 Ser Thr Leu Leu Ala Ala Arg Pro His Asp Tyr Ser Ala Asp Gly Phe
 515 520 525
 70 Asn Asp Trp Ala Phe Met Thr Thr His Ser Trp Asp Glu Asp Pro Ser
 530 535 540
 75 Gly Glu Trp Val Leu Glu Ile Glu Asn Thr Ser Glu Ala Asn Asn Tyr
 545 550 555 560
 80 Gly Thr Leu Thr Lys Phe Thr Leu Val Leu Tyr Gly Thr Ala Pro Glu
 565 570 575
 85 Gly Leu Pro Val Pro Pro Glu Ser Ser His His His His His His
 580 585 590

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 19:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 72 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:

CTAGAAATTCT TAGTGGTGAT GGTGATGATG TGCAGCTCCA CCAGCTGCAC TGCTTTCTGG

60

AGGTACGGGC AG

72

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 20:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 1794 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:

ATGGAGCTGA GGCCCTGGTT GCTATGGGTG GTAGCAGCAA CAGGAACCTT GGTCTTGCTA

60

GCAGCTGATG CTCAAGGGCA GAAGGTCTTC ACCAACACGT GGGCTGTGCG CATCCCTGGA

120

GGCCCAGCGG TGGCCAACAG TGTGGCACGG AAGCATGGGT TCCTCAACCT GGGCCAGATC

180

TTCGGGGACT ATTACCACTT CTGGCATCGA GGAGTGACGA AGCGGTCCCT GTGCCTCAC

240

CGCCCGCGGC ACAGCCGGCT GCAGAGGGAG CCTCAAGTAC AGTGGCTGGA ACAGCAGGTG

300

GCAAAGCGAC GGACTAAACG GGACGTGTAC CAGGAGCCCA CAGACCCCAA GTTCCCTCAG

360

CAGTGGTACC TGTCTGGTGT CACTCAGCGG GACCTGAATG TGAAGGCGGC CTGGCGCAG

420

GGCTACACAG GGCACGGCAT TGTGGTCTCC ATTCTGGACG ATGGCATCGA GAAGAACAC

480

CCGGACTTGG CAGGCAATTA TGATCCTGGG GCCAGTTTG ATGTCAATGA CCAGGACCT

540

GACCCCCAGC CTCGGTACAC ACAGATGAAT GACAACAGGC ACGGCACACG GTGTGCGGGG

600

GAAGTGGCTG CGGTGGCCAA CAACGGTGTCA TGTGGTGTAG GTGTGGCTA CAACGCCCGC

660

ATTGGAGGGG TGCGCATGCT GGATGGCGAG GTGACAGATG CAGTGGAGGC ACGCTCGCTG

720

GGCCTGAACC CCAACCACAT CCACATCTAC AGTGCCAGCT GGGGCCCCGA GGATGACGGC

780

AAGACAGTGG ATGGGCCAGC CCGCCTCGCC GAGGAGGCCT TCTTCCGTGG GGTTAGCCAG

840

GGCCGAGGGG GGCTGGCTC CATCTTGTC TGGGCCTCGG GGAACGGGGG CCGGAAACAT

900

5	GACAGCTGCA ACTGCGACGG CTACACCAAC AGTATCTACA CGCTGTCCAT CAGCAGCGCC	960
	ACGCAGTTTG GCAACGTGCC GTGGTACAGC GAGGCCTGCT CGTCCACACT GGCCACGACC	1020
	TACAGCAGTG GCAACCAGAA TGAGAAGCAG ATCGTGACGA CTGACTTGCG GCAGAAAGTGC	1080
10	ACGGAGTCTC ACACGGGCAC CTCAGCCTCT GCCCCCTTAG CAGCCGGCAT CATTGCTCTC	1140
	ACCCCTGGAGG CCAATAAGAA CCTCACATGG CGGGACATGC AACACCTGGT GGTACAGACC	1200
	TCGAAGCCAG CCCACCTCAA TGCCAACGAC TGGGCCACCA ATGGTGTGGG CCGGAAAGTG	1260
15	AGCCACTCAT ATGGCTACGG GCTTTGGAC GCAGGCGCCA TGGTGGCCCT GGCCCAGAAT	1320
	TGGACCACAG TGGCCCCCA GCGGAAGTGC ATCATCGACA TCCTCACCGA GCCCAAAGAC	1380
	ATCGGGAAAC GGCTCGAGGT GCGGAAGACC GTGACCGCGT GCCTGGCGA GCCAAACCAC	1440
20	ATCACTCGGC TGGAGCACGC TCAGGCGCGG CTCACCCCTGT CCTATAATCG CCGTGGCGAC	1500
	CTGGCCATCC ACCTGGTCAG CCCATGGGC ACCCGCTCCA CCCTGCTGGC AGCCAGGCCA	1560
	CATGACTACT CCGCAGATGG GTTTAATGAC TGGCCTTCA TGACAACTCA TTCTGGGAT	1620
25	GAGGATCCCT CTGGCGAGTG GGTCTTAGAG ATTGAAAACA CCAGCGAAGC CAAACAATAT	1680
	GGGACGCTGA CCAAGTTCAC CCTCGTACTC TATGGCACCG CCCCTGAGGG GCTGCCCGTA	1740
	CCTCCAGAAA GCAGTGCAGC TGGTGGAGCT GCACATCATC ACCATCACCA CTAA	1794
30		

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 21:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

35 (A) LÄNGE: 597 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 21:

40 Met Glu Leu Arg Pro Trp Leu Leu Trp Val Val Ala Ala Thr Gly Thr
 1 5 10 15

45 Leu Val Leu Leu Ala Ala Asp Ala Gln Gly Gln Lys Val Phe Thr Asn
 20 25 30

50 Thr Trp Ala Val Arg Ile Pro Gly Gly Pro Ala Val Ala Asn Ser Val
 35 40 45

55 Ala Arg Lys His Gly Phe Leu Asn Leu Gly Gln Ile Phe Gly Asp Tyr
 50 55 60

60 Tyr His Phe Trp His Arg Gly Val Thr Lys Arg Ser Leu Ser Pro His
 65 70 75 80

EP 0 775 750 A2

Arg Pro Arg His Ser Arg Leu Gln Arg Glu Pro Gln Val Gln Trp Leu
 85 90 95
 Glu Gln Gln Val Ala Lys Arg Arg Thr Lys Arg Asp Val Tyr Gln Glu
 100 105 110
 5 Pro Thr Asp Pro Lys Phe Pro Gln Gln Trp Tyr Leu Ser Gly Val Thr
 115 120 125
 10 Gln Arg Asp Leu Asn Val Lys Ala Ala Trp Ala Gln Gly Tyr Thr Gly
 130 135 140
 His Gly Ile Val Val Ser Ile Leu Asp Asp Gly Ile Glu Lys Asn His
 145 150 155 160
 15 Pro Asp Leu Ala Gly Asn Tyr Asp Pro Gly Ala Ser Phe Asp Val Asn
 165 170 175
 Asp Gln Asp Pro Asp Pro Gln Pro Arg Tyr Thr Gln Met Asn Asp Asn
 180 185 190
 20 Arg His Gly Thr Arg Cys Ala Gly Glu Val Ala Ala Val Ala Asn Asn
 195 200 205
 Gly Val Cys Gly Val Gly Val Ala Tyr Asn Ala Arg Ile Gly Gly Val
 210 215 220
 25 Arg Met Leu Asp Gly Glu Val Thr Asp Ala Val Glu Ala Arg Ser Leu
 225 230 235 240
 Gly Leu Asn Pro Asn His Ile His Ile Tyr Ser Ala Ser Trp Gly Pro
 245 250 255
 30 Glu Asp Asp Gly Lys Thr Val Asp Gly Pro Ala Arg Leu Ala Glu Glu
 260 265 270
 Ala Phe Phe Arg Gly Val Ser Gln Gly Arg Gly Leu Gly Ser Ile
 275 280 285
 35 Phe Val Trp Ala Ser Gly Asn Gly Arg Glu His Asp Ser Cys Asn
 290 295 300
 Cys Asp Gly Tyr Thr Asn Ser Ile Tyr Thr Leu Ser Ile Ser Ser Ala
 305 310 315 320
 40 Thr Gln Phe Gly Asn Val Pro Trp Tyr Ser Glu Ala Cys Ser Ser Thr
 325 330 335
 45 Leu Ala Thr Thr Tyr Ser Ser Gly Asn Gln Asn Glu Lys Gln Ile Val
 340 345 350
 Thr Thr Asp Leu Arg Gln Lys Cys Thr Glu Ser His Thr Gly Thr Ser
 355 360 365
 50 Ala Ser Ala Pro Leu Ala Ala Gly Ile Ile Ala Leu Thr Leu Glu Ala
 370 375 380
 Asn Lys Asn Leu Thr Trp Arg Asp Met Gln His Leu Val Val Gln Thr
 385 390 395 400
 55

EP 0 775 750 A2

5 Ser Lys Pro Ala His Leu Asn Ala Asn Asp Trp Ala Thr Asn Gly Val
405 410 415

5 Gly Arg Lys Val Ser His Ser Tyr Gly Tyr Gly Leu Leu Asp Ala Gly
420 425 430

10 Ala Met Val Ala Leu Ala Gln Asn Trp Thr Thr Val Ala Pro Gln Arg
435 440 445

15 Lys Cys Ile Ile Asp Ile Leu Thr Glu Pro Lys Asp Ile Gly Lys Arg
450 455 460

15 Leu Glu Val Arg Lys Thr Val Thr Ala Cys Leu Gly Glu Pro Asn His
465 470 475 480

20 Ile Thr Arg Leu Glu His Ala Gln Ala Arg Leu Thr Leu Ser Tyr Asn
485 490 495

25 Arg Arg Gly Asp Leu Ala Ile His Leu Val Ser Pro Met Gly Thr Arg
500 505 510

25 Ser Thr Leu Leu Ala Ala Arg Pro His Asp Tyr Ser Ala Asp Gly Phe
515 520 525

30 Asn Asp Trp Ala Phe Met Thr Thr His Ser Trp Asp Glu Asp Pro Ser
530 535 540

35 Gly Glu Trp Val Leu Glu Ile Glu Asn Thr Ser Glu Ala Asn Asn Tyr
545 550 555 560

40 Gly Thr Leu Thr Lys Phe Thr Leu Val Leu Tyr Gly Thr Ala Pro Glu
565 570 575

45 Gly Leu Pro Val Pro Pro Glu Ser Ser Ala Ala Gly Gly Ala Ala His
580 585 590

45 His His His His
595

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 22:

45 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 50 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

50 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 22:

55 TGAGGGAGGT GGGGGAGGTC ATCACCAACCA TCACCATCAT CATCACCAATT

50

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 23:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 51 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 23:

AATTAATGGT GATGATGATG TGATGGTGG TGATGACCTC CCCCACCTCC

51

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 24:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 66 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 24:

GGACCCCTCT GGCGAGTGGG TCCTCGAGAT TGAAACACC AGCGAAGCCA ACAACTATGG

25 60

30 GACGCT

66

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 25:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 69 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 25:

40 TCAAGCGTCC CATAAGTTGTT GGCTTCGCTG GTGTTTCAA TCTCGAGGAC CCACTCGCCA

45 60

70 GAGGGGTCC

69

50 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 26:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 69 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 26:

TCAAGCGTCC CATAGTTGTT GGCTTCGCTG GTGTTTCAA TCTCGAGGAC CCACCTGGCCA 60

10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 27:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 24 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 27:

ATTACAATTG CTGCAGGGAT CCAC

34

Patentansprüche

30 1. Fusionsprotein, dadurch gekennzeichnet, daß es ein gegebenenfalls C-terminal deletiertes Furinderivat oder ein Derivat eines Furinanalogen fusioniert mit einer heterologen Sequenz umfaßt.

35 2. Fusionsprotein nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die C-terminale Deletion die cytoplasmatische und transmembrane Region, und gegebenenfalls die Cys-reiche Region umfaßt.

35 3. Fusionsprotein nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die heterologe Sequenz ein Protein, ein Polypeptid oder ein Affinitätspeptid ist.

40 4. Fusionsprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Protein oder Polypeptid abgeleitet ist von β -Galaktosidase, Glutathion-S-transferase, c-myc-Produkt, Avidin oder Lysin-bindende Kringel-domäne von Plasmaproteinen, wie Plasminogen.

45 5. Fusionsprotein nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Affinitätspeptid ein Tag-Peptid ist, vorzugsweise ein His-Tag.

45 6. Fusionsprotein nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Affinitätspeptid aus mehreren, vorzugsweise 3 bis 20, besonders bevorzugt 6 bis 15 aufeinanderfolgenden Histidin-Resten besteht.

50 7. Fusionsprotein nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß es Furin Δ TM-His oder Furin Δ Cys-His, vorzugsweise ein Furin Δ TM-His gemäß Seq.ID 9 oder ein Furin Δ Cys-His gemäß Seq.ID No. 18 ist.

55 8. Fusionsprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen der Furin-Sequenz und der heterologen Sequenz ein Spacer inseriert ist.

55 9. Fusionsprotein nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß es Furin Δ TM-Spacer-His oder Furin Δ Cys-Spacer-His ist.

10. Fusionsprotein nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Furin Δ TM-Spacer-His gemäß Seq.ID No.

12 oder FurinΔCys-Spacer-His gemäß Seq. ID. No. 21 ist.

11. Fusionsprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß es Affinität zu einem festen Träger besitzt.

12. Fusionsprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß es an einen festen Träger immobilisiert ist.

13. Fusionsprotein nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger einen Antikörper oder ein (Schwer-)Metallion umfaßt.

14. DNA-Sequenz kodierend für ein Fusionsprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 10.

15. DNA-Sequenz nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Sequenz gemäß Seq.ID. No. 8, Seq.ID. No. 11, Seq.ID. No. 17, Seq.ID. No. 20 ist.

16. Expressionsvektor enthaltend eine DNA-Sequenz nach Anspruch 14 oder 15.

17. Transformierte Zellen enthaltend einen Expressionsvektor nach Anspruch 16.

18. Fusionsprotein-Komplex enthaltend ein Fusionsprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 13 adsorbiert an einen festen Träger.

19. Verfahren zur Herstellung von Proteinen aus Pro-Proteinen, dadurch gekennzeichnet, daß ein Pro-Protein durch ein Fusionsprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 13 proteolytisch gespalten wird.

20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß ein Pro-Protein durch rekombinante Coexpression mit einem Fusionsprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 13 in vivo gespalten wird.

21. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß das Pro-Protein durch ein Fusionsprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 13 in vitro gespalten wird.

22. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß beide Reaktionspartner in Lösung vorliegen.

23. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß ein Pro-Protein durch Kokultivierung von rekombinanten Zelllinien, die ein Pro-Protein oder ein Fusionsprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 13 exprimieren, gespalten wird.

24. Verfahren nach Anspruch 22 oder 23, dadurch gekennzeichnet, daß die Lösung ein Zellkulturüberstand von rekombinanten Zelllinien ist.

25. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß die Lösung gereinigte Proteine enthält.

26. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß einer der Reaktionspartner immobilisiert ist.

27. Verfahren nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß das Pro-Protein immobilisiert ist und das Fusionsprotein in Lösung vorliegt.

28. Verfahren nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß das Pro-Protein an einen Antikörper immobilisiert ist.

29. Verfahren nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß das Fusionsprotein immobilisiert ist und das Pro-Protein in Lösung vorliegt.

30. Verfahren nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, daß das Fusionsprotein an einem Affinitätsträger immobilisiert ist.

31. Verfahren nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, daß der Affinitätsträger ein Schwermetall oder ein Antikör-

per ist.

5 32. Verfahren nach einem der Ansprüche 19 bis 31, dadurch gekennzeichnet, daß das Pro-Protein eine inaktive Vorstufe eines Plasmaproteins, vorzugsweise Faktor IX, von Willebrand-Faktor, Faktor VII, Faktor X, Faktor XI, Faktor V, Protein C, Protein S, Albumin oder eines viralen Proteins, vorzugsweise HIV gp160 und Influenzavirus HA, ist.

10 33. Verfahren zum Herstellen eines Fusionsprotein-Komplexes nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß ein Fusionsprotein gemäß einem der Ansprüche 1 bis 13 mit einem festen Träger, welcher das Fusionsprotein binden kann, in Kontakt gebracht wird.

15 34. Verfahren nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, daß eine Lösung enthaltend ein Fusionsprotein mit einem Träger in Kontakt gebracht wird.

20 35. Verfahren nach Anspruch 34, dadurch gekennzeichnet, daß die Lösung ein Kulturüberstand von rekombinanten Zelllinien ist.

25 36. Verfahren nach Anspruch 34, dadurch gekennzeichnet, daß die Lösung gereinigtes Fusionsprotein enthält.

30 37. Verfahren nach Anspruch 33 bis 36, dadurch gekennzeichnet, daß der feste Träger ausgewählt ist aus einem immobilisierten (Schwer-)Metallion, einem immobilisierten Antikörper oder einem immobilisierten Peptid oder Po-lypeptid.

35 38. Verwendung eines Fusionsproteins nach einem der Ansprüche 1 bis 13 für ein Verfahren nach einem der Ansprüche 19 bis 32.

40 39. Verwendung eines Fusionsprotein-Komplexes nach Anspruch 18 für ein Verfahren nach einem der Ansprüche 19 bis 32.

45 40. Verwendung eines Fusionsproteins nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Herstellung eines Proteins aus Pro-Protein, insbesondere von Faktor IX aus pro-Faktor IX, von Willebrand-Faktor aus pro-von Willebrand-Faktor, Faktor X aus pro-Faktor X, Faktor XI aus pro-Faktor XI, Faktor VII aus pro-Faktor VII, Faktor V aus pro-Faktor V, Protein C aus pro-Protein C und Albumin aus pro-Albumin.

50 41. Verwendung eines Fusionsprotein-Komplexes nach Anspruch 18 zur Herstellung eines Proteins aus Pro-Protein, insbesondere von Faktor IX aus pro-Faktor IX, von Willebrand-Faktor aus pro-von Willebrand-Faktor, Faktor X aus pro-Faktor X, Faktor XI aus pro-Faktor XI, Faktor VII aus pro-Faktor VII, Faktor V aus pro-Faktor V, Protein C aus pro-Protein C und Albumin aus pro-Albumin.

55 42. Verwendung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 19 bis 32 zur Herstellung eines Proteins aus Pro-Protein, insbesondere von Faktor IX aus pro-Faktor IX, von Willebrand-Faktor aus pro-von Willebrand-Faktor, Faktor X aus pro-Faktor X, Faktor XI aus pro-Faktor XI, Faktor VII aus pro-Faktor VII, Faktor V aus pro-Faktor V, Protein C aus pro-Protein C und Albumin aus pro-Albumin.

60 43. Pharmazeutische Zusammensetzung enthaltend ein gemäß einem Verfahren nach einem der Ansprüche 19 bis 32 hergestelltes Protein, insbesondere Faktor IX, Faktor X, Faktor XI, von Willebrand-Faktor, Faktor V, Faktor VII, Protein C, Albumin und einen oder mehrere physiologisch akzeptable Träger.

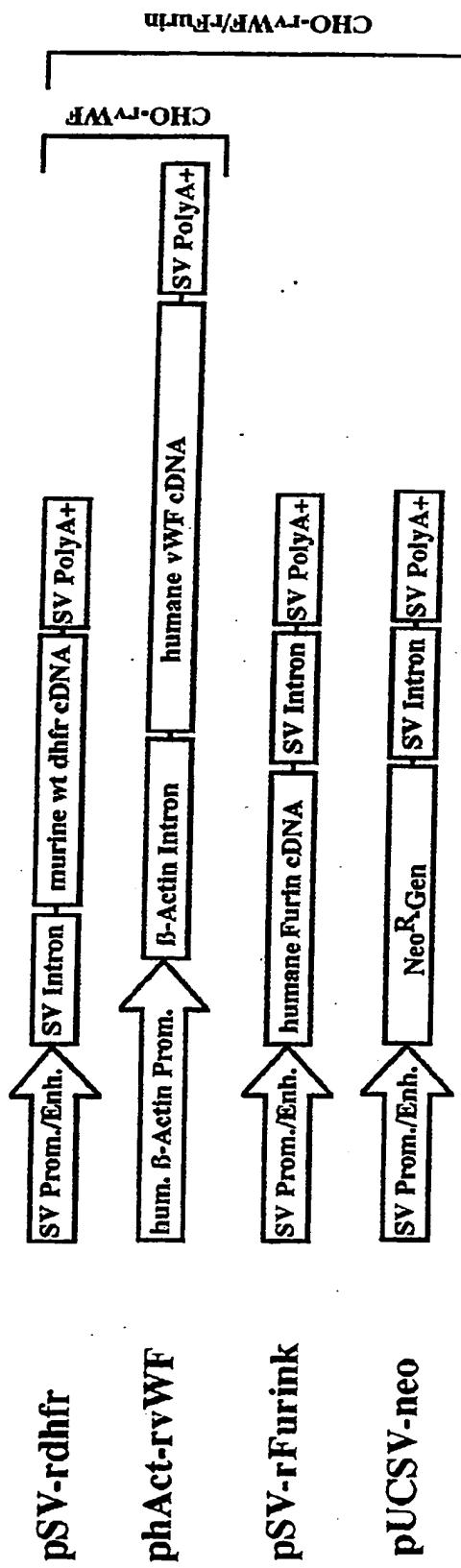
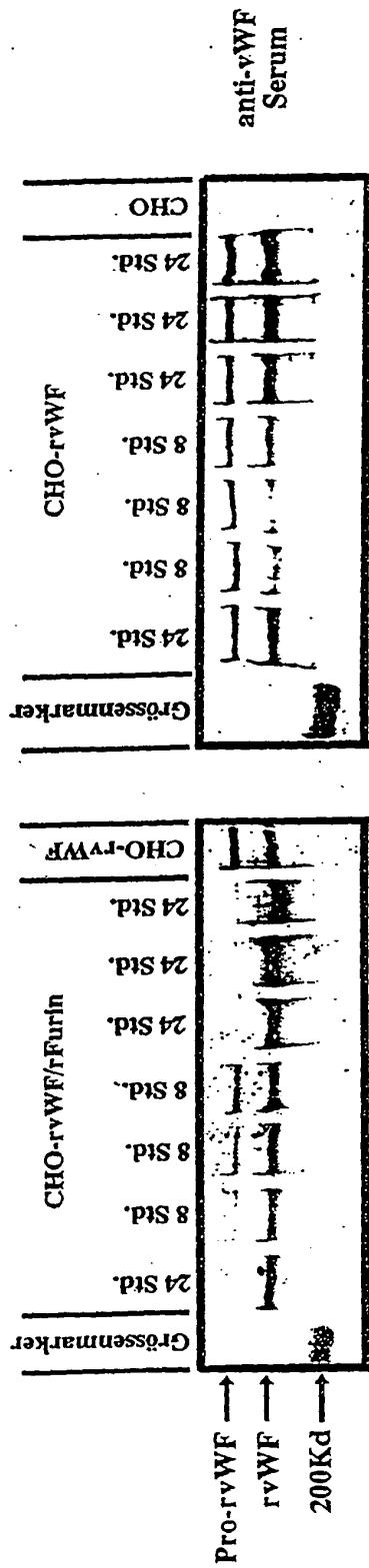
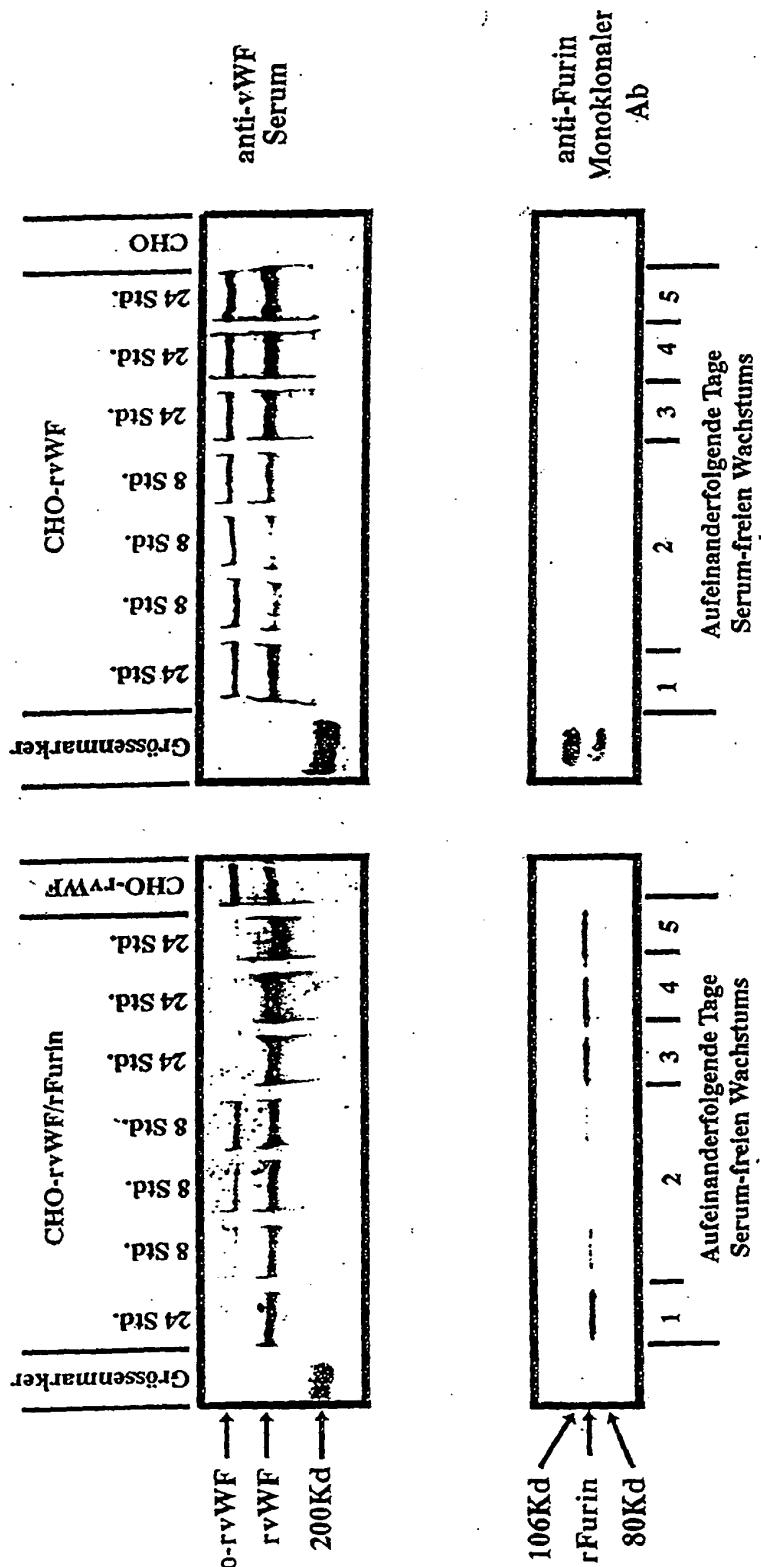


FIG. 1

IA



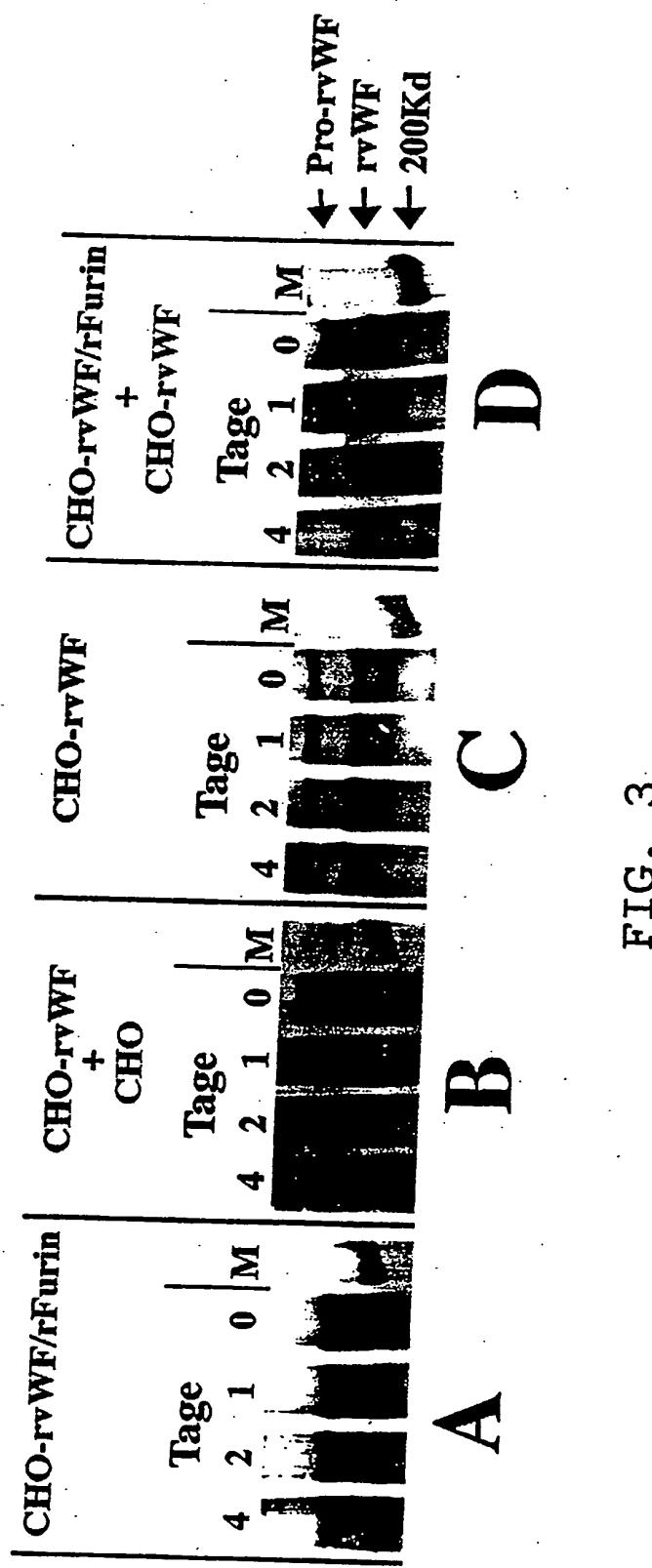
III A



B

FIG. 2





Wild-type human rFurin

794 Aminoacids (primary translation product); 107 Aminoacids Prepro-Leader sequence, 687 Aminoacids mature furin; catalytic domain AA 108 to 430; middle domain AA 431 to 569; Cys-rich region AA 570 to 660; Transmembrane region AA 695 to 720; Cytosolic region AA 721 to 794. These boundaries represent approximated values rather than distinct boundaries!

Mature wt Furin is 687 amino acids in length.

(-107)

1

Frame 1 Met Glu Leu Arg Pro Trp Leu Leu Trp Val Val Ala Ala Thr Gly Thr Leu Val Leu
 ATG GAG CTG AGG CCC TGG TTG CTA TGG GTG GAA GCA GCA ACA GGA ACC TGG GTC CTC
 9 18 27 36 45 54

Leu Ala Ala Asp Ala Gln Gly Gln Lys Val Phe Thr Asn Thr Trp Ala Val Arg Ile Pro Gly
 CTA GCA GCT GAT GCT CAG GGC CAG AAG GTC TTC ACC AAC ACG TGG GCT GTG CGC ATC CCT GGA
 66 75 84 93 102 111 120

Gly Pro Ala Val Ala Asn Ser Val Ala Arg Lys His Gly Phe Leu Asn Leu Gly Gln Ile Phe
 GGC CCA GCG GTG GCC AAC AGT GTG GCA CGG AAG CAT GGG TTC CTC AAC CIG GGC CAG ATC TIC
 129 138 147 156 165 174 183

Gly Asp Tyr Tyr His Phe Trp His Arg Gly Val Thr Lys Arg Ser Leu Ser Pro His Arg Pro
 GGG GAC TAT TAC CAC TTC TGG CAT CGA GGA GTG ACG AAG CGG TCC CTC TCG CCT CAC CGC CGG
 192 201 210 219 228 237 246

Arg His Ser Arg Leu Gln Arg Glu Pro Gln Val Gln Trp Leu Glu Gln Gln Val Ala Lys Arg
 CGG CAC ASC CGG CTG CAG AGG GAG CCT CAA GTC CAG TGG CTC GAA CAG CAG GTG GCA AAG CGA
 255 264 273 282 291 300 309

(-1) (+1)

107 108

Arg Thr Lys Arg Asp Val Tyr Gln Glu Pro Thr Asp Pro Lys Phe Pro Gln Gln Trp Tyr Leu
 CGG ACT AAA CGG GAC GTG TAC CAG GAG CCC ACA GAC CCC AAG TTT CCT CAG CAG TGG TAC CTC
 318 327 336 345 354 363 372

Ser Gly Val Thr Gln Arg Asp Leu Asn Val Lys Ala Ala Trp Ala Gln Gly Tyr Thr Gly His
 TCT GGT GTC ACT CAG CGG GAC CTG AAT GTG AAG GCG GCC TGG GCG CAG GGC TAC ACA GGG CAC
 381 390 399 408 417 426 435

Gly Ile Val Val Ser Ile Leu Asp Asp Gly Ile Glu Lys Asn His Pro Asp Leu Ala Gly Asn
 GGC ATT GTG GTC TCC ATT CTG GAC GAT GGC ATC GAG AAC CAC CCG GAC TGG GCA GGC AAT
 444 453 462 471 480 489 498

Tyr Asp Pro Gly Ala Ser Phe Asp Val Asn Asp Gln Asp Pro Asp Pro Gln Pro Arg Tyr Thr
 TAT GAT CCT GGG GCC AGT TTT GAT GTC AAT GAC CAG GAC CCT GAC CCC CAG CGG TAC ACA
 507 516 525 534 543 552 561

Gln Met Asn Asp Asn Arg His Gly Thr Arg Cys Ala Gly Glu Val Ala Ala Val Ala Asn Asn
 CAG ATG AAT GAC AAC AGG CAC GGC ACA CGG TGT GCG GGG GAA GTG GCT GCG GTG GCC AAC AAC
 570 579 588 597 606 615 624

Gly Val Cys Gly Val Gly Val Ala Tyr Asn Ala Arg Ile Gly Gly Val Arg Met Leu Asp Gly
 CGT CTC TGT GGT GTA GGT GTG GCC AAC GCC CGC ATT GGA GGG GTG CGC ATG CTG GAT GGC
 633 642 651 660 669 678 687

FIG. 4-A



EP 0 775 750 A2

Glu Val Thr Asp Ala Val Glu Ala Arg Ser Leu Gly Leu Asn Pro Asn His Ile His Ile Tyr
 GAG GTG ACA GAT GCA GTG GAG GCA CGC TCG CTG GGC CTG AAC CCC AAC CAC ATC CAC ATC TAC
 696 705 714 723 732 741 750

Ser Ala Ser Trp Gly Pro Glu Asp Asp Gly Lys Thr Val Asp Gly Pro Ala Arg Leu Ala Glu
 AGT GCC AGC TGG GGC CCC GAG GAT GAC GGC AAG ACA GTG GAT GGG CCA GCC CGC CTC GCC GAG
 759 768 777 786 795 804 813

Glu Ala Phe Phe Arg Gly Val Ser Gln Gly Arg Gly Leu Gly Ser Ile Phe Val Trp Ala
 GAG GCC TTC TTC CGT GGG GTT AGC CAG GGC CGA GGG GGG CTG GGC TCC ATC TTT GTC TGG GCC
 822 831 840 849 858 867 876

Ser Gly Asn Gly Gly Arg Glu His Asp Ser Cys Asn Cys Asp Gly Tyr Thr Asn Ser Ile Tyr
 TCG GGG AAC GGG GGC CGG GAA CAT GAC AGC TGC AAC TGC GAC GGC TAC ACC AAC AGT ATC TAC
 885 894 903 912 921 930 939

Thr Leu Ser Ile Ser Ser Ala Thr Gln Phe Gly Asn Val Pro Trp Tyr Ser Glu Ala Cys Ser
 ACG CTG TCC ATC AGC AGC GCC ACG CAG TTT GGC AAC GTG CCG TGG TAC AGC GAG GCC TGC TCG
 948 957 966 975 984 993 1002

Ser Thr Leu Ala Thr Thr Tyr Ser Ser Gly Asn Gln Asn Glu Lys Gln Ile Val Thr Thr Asp
 TCC ACA CTG GCC ACG ACC TAC AGC AGT GGC AAC CAG ATT GAG AAG CAG ATC GTG AGC ACT GAC
 1011 1020 1029 1038 1047 1056 1065

Leu Arg Gln Lys Cys Thr Glu Ser His Thr Gly Thr Ser Ala Ser Ala Pro Leu Ala Ala Gly
 TTG CCG CAG AAG TGC ACG GAG TCT CAC ACG GGC ACC TCA GCC TCT GCC CCC TTA GCA GCC GGC
 1074 1083 1092 1101 1110 1119 1128

Ile Ile Ala Leu Thr Leu Glu Ala Asn Lys Asn Leu Thr Trp Arg Asp Met Gln His Leu Val
 ATC ATT GCT CTC ACC CTG GAG GCC AAT AAG AAC CTC ACA TGG CGG GAC ATG CAA CAC CTG GTG
 1137 1146 1155 1164 1173 1182 1191

Val Gln Thr Ser Lys Pro Ala His Leu Asn Ala Asn Asp Trp Ala Thr Asn Gly Val Gly Arg
 GTA CAG ACC TCG AAG CCA GCC CAC CTC AAT GCC AAC GAC TGG GCC ACC AAT GGT GTG GGC CGG
 1200 1209 1218 1227 1236 1245 1254

(+323)

430

Lys Val Ser His Ser Tyr Gly Tyr Gly Leu Leu Asp Ala Gly Ala Met Val Ala Leu Ala Gln
 AAA GTG AGC CAC TCA TAT GGC TAC GGG CTT TTG GAC GCA GGC GGC ATG GTG GCC CTG GCC CAG
 1263 1272 1281 1290 1299 1308 1317

Asn Trp Thr Thr Val Ala Pro Gln Arg Lys Cys Ile Ile Asp Ile Leu Thr Glu Pro Lys Asp
 AAT TGG ACC ACA GTG GCC CCC CAG CGG AAG TGC ATC ATC GAC ATC CTC ACC GAG CCC AAA GAC
 1326 1335 1344 1353 1362 1371 1380

Ile Gly Lys Arg Leu Glu Val Arg Lys Thr Val Thr Ala Cys Leu Gly Glu Pro Asn His Ile
 ATC GGG AAA CGG CTC GAG GTG CCG AAG ACC GTG ACC GCG TGC CTG GGC GAG CCC AAC CAC ATC
 1389 1398 1407 1416 1425 1434 1443

Thr Arg Leu Glu His Ala Gln Ala Arg Leu Thr Leu Ser Tyr Asn Arg Arg Gly Asp Leu Ala
 ACT CGG CTG GAG CAC GCT CAG GCG CGG CTC ACC CTG TCC TAT AAT CGC CGT GGC GAC CTG GCC
 1452 1461 1470 1479 1488 1497 1506

FIG. 4-B

EP 0 775 750 A2

Ile His Leu Val Ser Pro Met Gly Thr Arg Ser Thr Leu Leu Ala Ala Arg Pro His Asp Tyr
 ATC CAC CTG GTC AGC CCC ATG GGC ACC CGC TCC ACC CTG CTG GCA GCC AGG CCA CAT GAC TAC
 1515 1524 1533 1542 1551 1560 1569

Ser Ala Asp Gly Phe Asn Asp Trp Ala Phe Met Thr Thr His Ser Trp Asp Glu Asp Pro Ser
 TCC GCA GAT GGG TTT AAT GAC TGG GCC TTC ATG ACA ACT CAT TCC TGG GAT GAG GAT CCC TCT
 1578 1587 1596 1605 1614 1623 1632

Gly Glu Trp Val Leu Glu Ile Glu Asn Thr Ser Glu Ala Asn Asn Tyr Gly Thr Leu Thr Lys
 GGC GAG TGG GTC CTA GAG ATT GAA AAC ACC AGC GAA GCC AAC TAT GGG ACG CTG ACC AAG
 1641 1650 1659 1668 1677 1686 1695

(+462) (+463)
 569 570 (+473)
 580 (+478)
 585
 Phe Thr Leu Val Leu Tyr Gly Thr Ala Pro Glu Gly Leu Pro Val Pro Pro Glu Ser Ser Gly
 TTC ACC CTC GTC CTC TAT GGC ACC GCC CCT GAG GGG CTG CCC GTC CCT CCA GAA AGC AGT GGC
 1704 1713 1722 1731 1740 1749 1758

Cys Lys Thr Leu Thr Ser Ser Gln Ala Cys Val Val Cys Glu Glu Gly Phe Ser Leu His Gln
 TGC AAG ACC CTC ACG TCC AGT CAG GGC TGT GTG TGC GAG GAA GGC TTC TCC CTG CAC CAG
 1767 1776 1785 1794 1803 1812 1821

Lys Ser Cys Val Gln His Cys Pro Pro Gly Phe Ala Pro Gln Val Leu Asp Thr His Tyr Ser
 AAG AGC TGT GTC CAG CAC TGC CCT CCA GGC TTC GCC CCC CAA GTC CTC GAT ACG CAC TAT AGC
 1830 1839 1848 1857 1866 1875 1884

Thr Glu Asn Asp Val Glu Thr Ile Arg Ala Ser Val Cys Ala Pro Cys His Ala Ser Cys Ala
 ACC GAG AAT GAC GTG GAG ACC ATC CGG GCC ACC GTC TGC GCC CCC TGC CAC GCC TCA TGT GCC
 1893 1902 1911 1920 1929 1938 1947

(+553)
 660
 Thr Cys Gln Gly Pro Ala Leu Thr Asp Cys Leu Ser Cys Pro Ser His Ala Ser Leu Asp Pro
 ACA TGC CAG GGG CGG GCC CTG ACA GAC TGC CTC AGC TGC CCC AGC CAC GCC TCC TTG GAC CCT
 1956 1965 1974 1983 1992 2001 2010

Val Glu Gln Thr Cys Ser Arg Gln Ser Ser Arg Glu Ser Pro Pro Gln Gln Gln Pro
 GTG GAG CAG ACT TGC TCC CCG CAA AGC CAG AGC AGC CGA GAG TCC CCG CCA CAG CAG CAG CCA
 2019 2028 2037 2046 2055 2064 2073

(+588)
 695 (+600) (+602)
 707 709
 Pro Arg Leu Pro Pro Glu Val Glu Ala Gly Gln Arg Leu Arg Ala Gly Leu Leu Pro Ser His
 CCT CGG CTG CCC CCG GAG GTG GAG GGG CAA CGG CTG CGG GCA GGG CTG CTG CCC TCA CAC
 2082 2091 2100 2109 2118 2127 2136

(+613)
 720
 Leu Pro Glu Val Val Ala Gly Leu Ser Cys Ala Phe Ile Val Leu Val Phe Val Thr Val Phe
 CTG CCT GAG GTG GCC GGC CTC AGC TGC GCC TTC ATC GTG CTG GTC TTC GTC ACT GTC TTC
 2145 2154 2163 2172 2181 2190 2199

Leu Val Leu Gln Leu Arg Ser Gly Phe Ser Phe Arg Gly Val Lys Val Tyr Thr Met Asp Arg
 CTG GTC CTG CAG CTG CGC TCT GGC TTT AGT TTT CGG GGG GTG AAG GTG TAC ACC ATG GAC CGT

FIG. 4-C

2208 2217 2226 2235 2244 2253 2262

Gly Leu Ile Ser Tyr Lys Gly Leu Pro Pro Glu Ala Trp Gln Glu Glu Cys Pro Ser Asp Ser
GGC CTC ATC TCC TAC AAG GGG CTG CCC CCT GAA GCC TGG CAG GAG TGC CCG TCT GAC TCA
2271 2280 2289 2298 2307 2316 2325

(+687)

794

Glu Glu Asp Glu Gly Arg Gly Glu Arg Thr Ala Phe Ile Lys Asp Gln Ser Ala Leu TER
GAA GAG GAC GAG GGC CGG GGC GAG AGG ACC GCC TTT ATC AAA GAC CAG AGC GCC CTC TGA
2334 2343 2352 2361 2370 2379

FIG. 4-D



FIG. 5

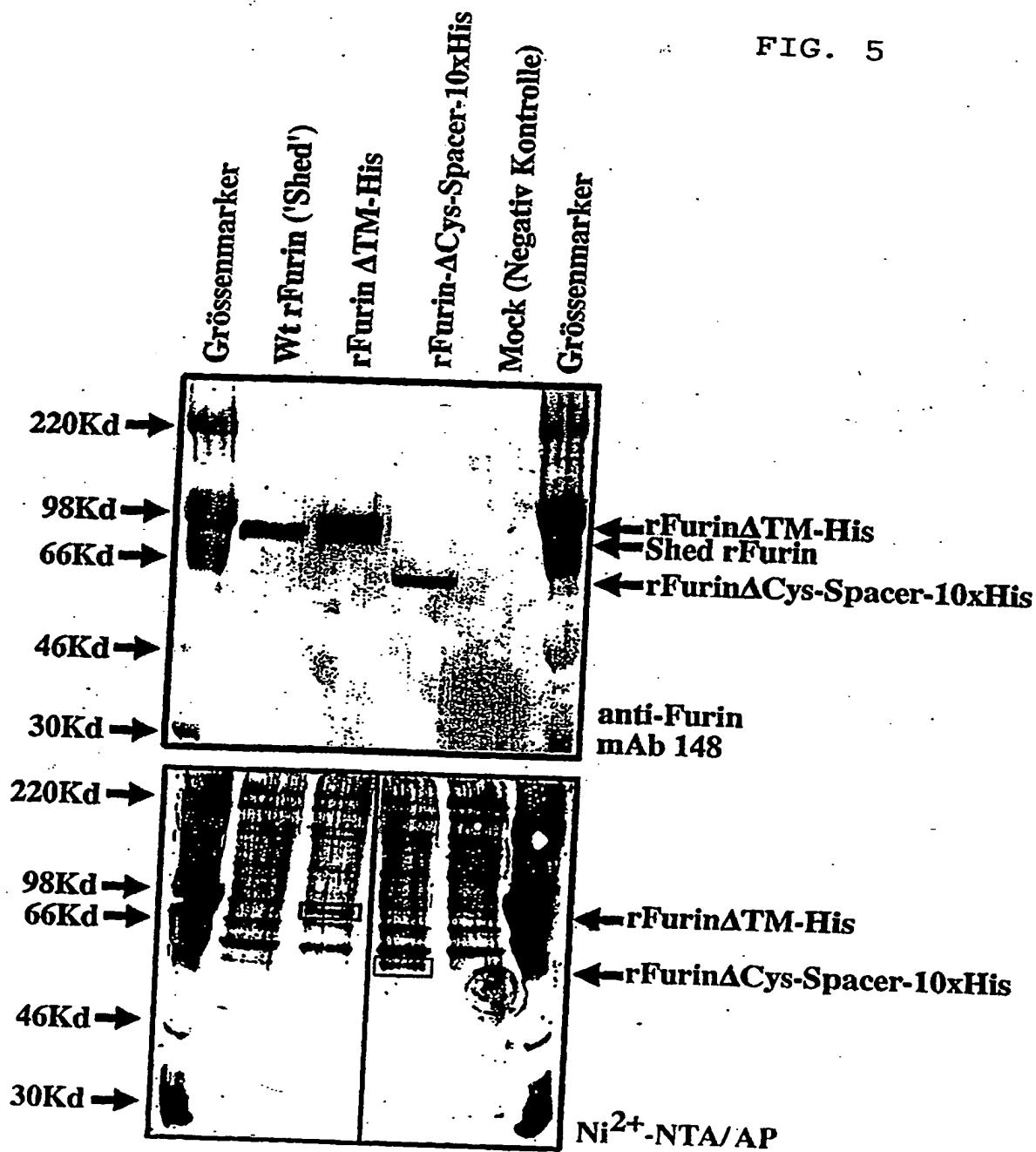




FIG. 6

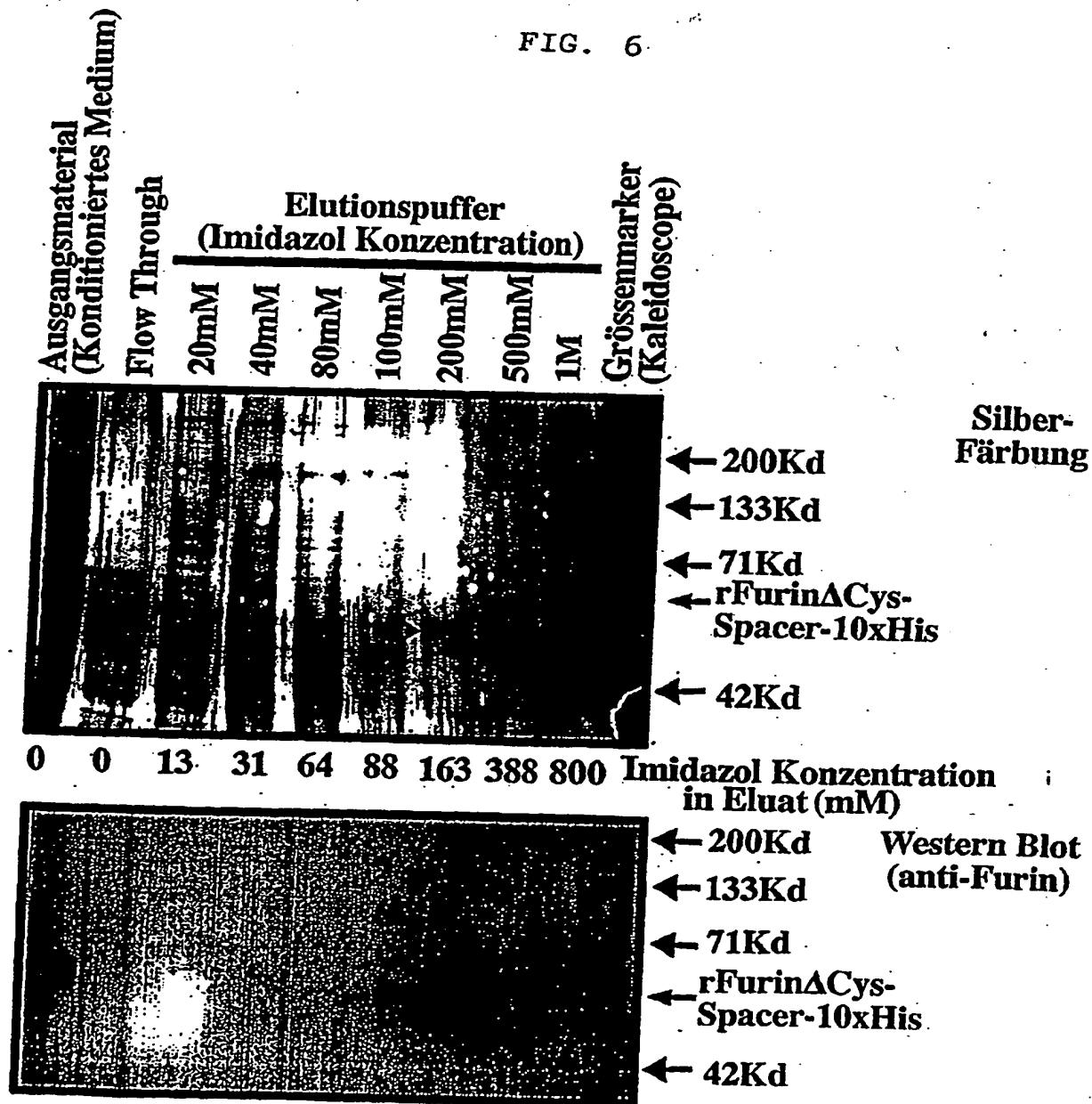
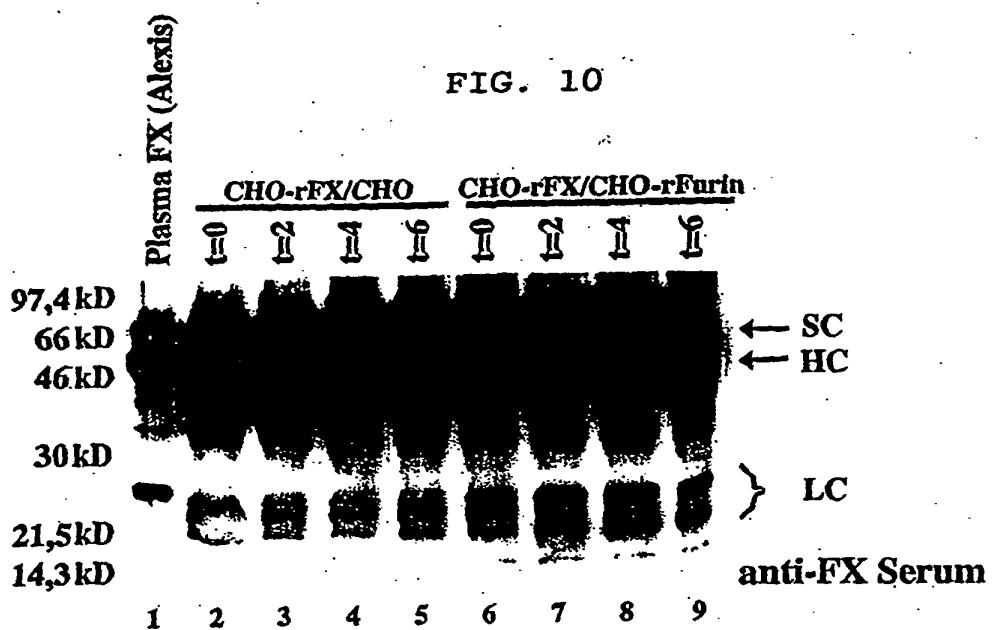


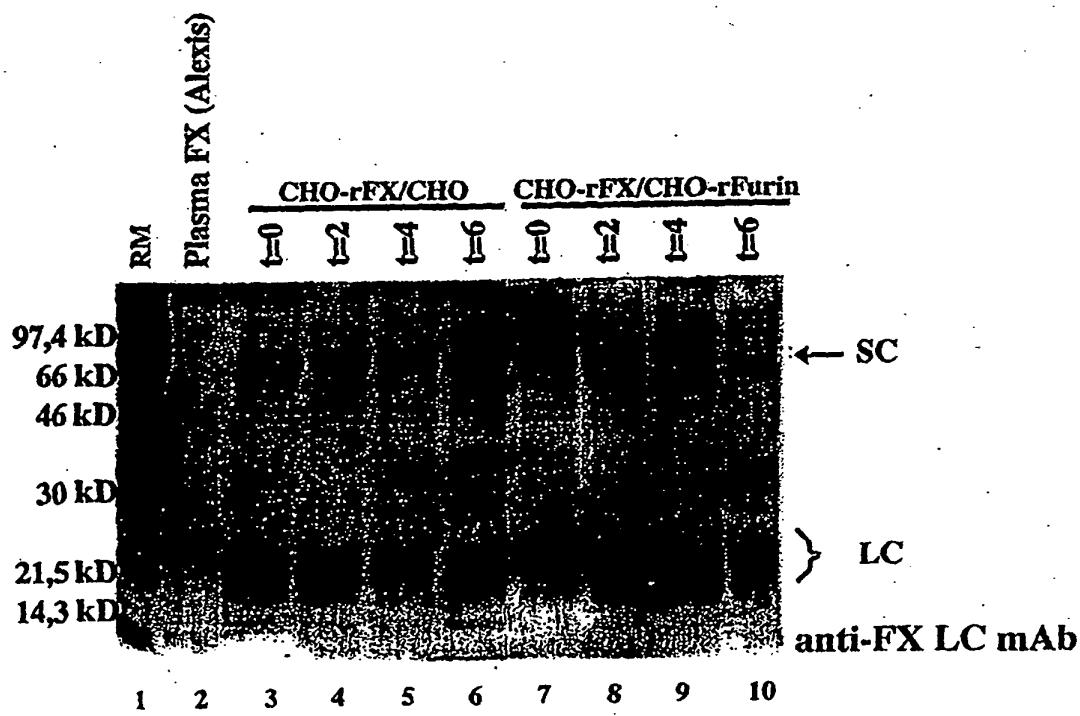


FIG. 10

A



B



t= Inkubation bei 37°C angegen in Stunden

Grössenmarker

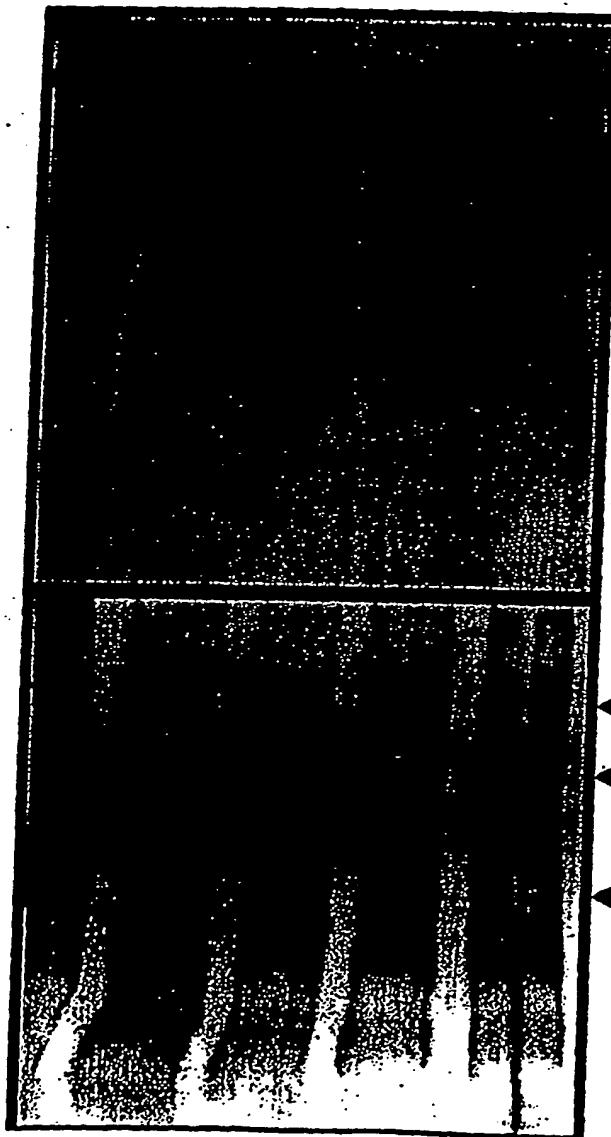
$t=0$ Stunden

$t=4$ Stunden

$t=18$ Stunden

$t=25$ Stunden

FIG. 7



+ rFurin
↑ Pro-rvWF
↑ rvWF
↑ 200Kd

- rFurin
↑ Pro-rvWF
↑ rvWF
↑ 200Kd

FIG. 8

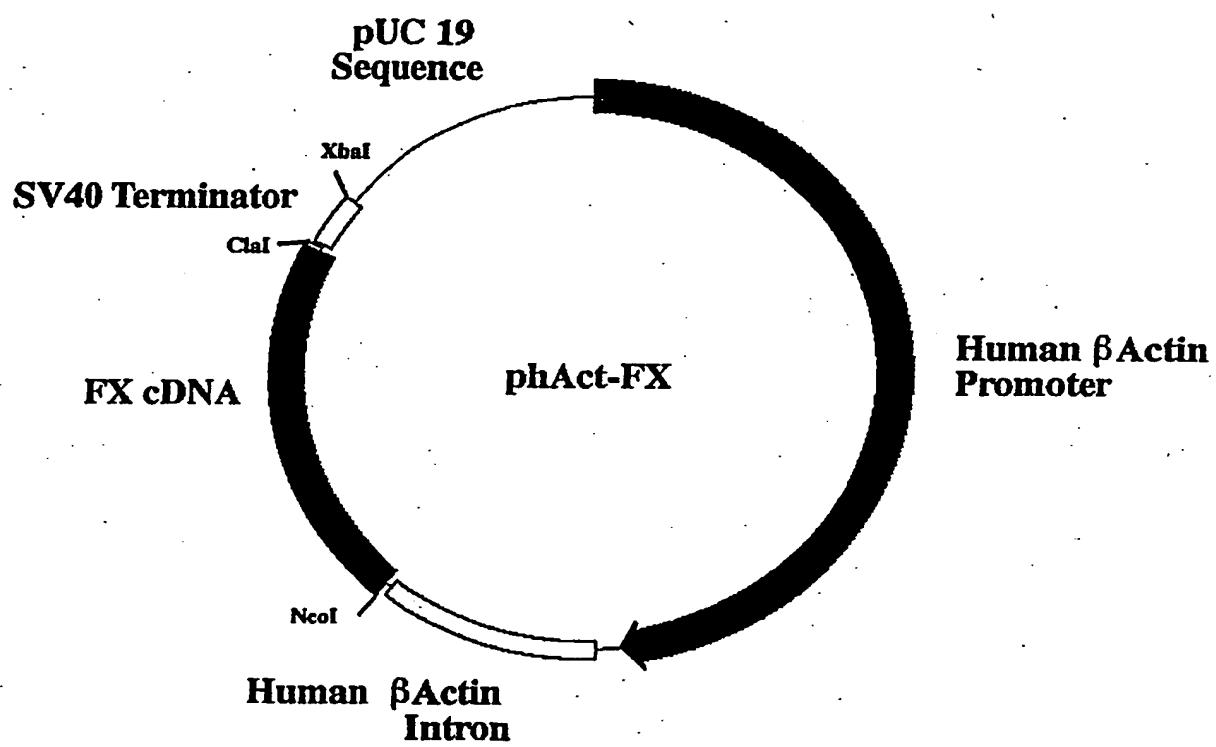




FIG. 9

